

Aus der Abteilung Biochemie I
(Prof. Dr. rer. nat. F. Melchior)
im Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Expression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen in
Kupfferzellen der Rattenleber unter Normal- und
Entzündungsbedingungen**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
ANNIKA WIRTH
aus
BREMERHAVEN

Göttingen 2006

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatterin: PD. Dr. rer. nat. H. Schieferdecker

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Aufgaben der Leber.....	1
1.2 Aufbau der Leber.....	1
1.3 Beteiligung der Leber an Entzündungsreaktionen.....	3
1.3.1 Bakterielle Lipopolysaccharide als Auslöser von Entzündungsreaktionen.....	4
1.3.2 Rolle der Kupfferzellen während Abwehr und Entzündung	5
1.3.2.1 Vermittlung von LPS-Signalen in Kupfferzellen.....	5
1.3.2.2 LPS-induzierte Reaktionen in Kupfferzellen	6
1.3.2.3 Funktionen der von den Kupfferzellen der Leber freigesetzten Zytokine und Prostanoiden.....	6
1.3.2.4 Veränderte Zytokin- und Prostanoidexpression unter Entzündungsbedingungen	7
1.4 Aufgabenstellung	8
2. MATERIAL	11
2.1 Tiere und Tierhaltung.....	11
2.2 Geräte	11
2.3 Chemikalien und Biochemikalien.....	12
2.4 Verbrauchsmaterialien	13
2.5 Reinigungs- und Nachweissysteme („Kits“).....	13
2.6 Enzyme	14
2.7 Oligonukleotide	15
2.8 Stammlösungen und Zellkulturmedien	15
3. METHODEN	18
3.1 Tierexperimentelle Methoden: LPS-Behandlung <i>in vivo</i>	18
3.2 Zellbiologische Methoden.....	18
3.2.1 Isolierung von Kupfferzellen (modifiziert nach BROWER et al. 1984; EYHORN et al. 1988)	18
3.2.1.1 Nicht-rezirkulierende <i>in-situ</i> -Präperfusion der Rattenleber.....	19

3.2.1.2	Rezirkulierende <i>ex-situ</i> -Perfusion.....	19
3.2.1.3	Separation von Kupferzellen.....	19
3.2.2	Zellkultivierung - Monokultur von Kupferzellen.....	22
3.2.3	Zellkultorexperimente	23
3.2.3.1	Gewinnung von Kupferzellen zur Gesamt-RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	23
3.2.3.2	Gewinnung von Zellkulturüberständen	23
3.3	Molekularbiologische Methoden	23
3.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Kupferzellen.....	23
3.3.2	Synthese von cDNA	24
3.3.3	PCR (Polymerase chain reaction).....	25
3.3.3.1	Quantifizierung von mRNA mittels LightCycler Polymerase Chain Reaction (LC-PCR) und Schmelzkurvenanalyse.....	25
3.4	Biochemische Methoden	28
3.4.1	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)	28
3.4.2	Radioimmunoassay (RIA).....	28
3.5	Statistische Auswertung.....	29
4.	ERGEBNISSE	30
4.1	Veränderte basale Zytokinexpression in Kupferzellen unter Entzündungsbedingungen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>.....	30
4.1.1	Einfluss einer längerfristigen LPS-Behandlung <i>in vivo</i> auf die basale Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6	30
4.1.2	Einfluss einer längerfristigen LPS-Behandlung <i>in vitro</i> auf die basale Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6	33
4.1.3	Einfluss einer längerfristigen LPS-Behandlung <i>in vivo</i> auf die basale Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10	38
4.1.4	Einfluss einer längerfristigen LPS-Behandlung <i>in vitro</i> auf die basale Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10	40
4.1.5	Einfluss einer längerfristigen LPS-Behandlung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> auf die basale Expression von ProstaglandinD ₂	42
4.2	Veränderte Reaktivität von Kupferzellen auf kurzfristige LPS-Stimulation unter Entzündungsbedingungen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	44
4.2.1	Einfluss einer längerfristigen LPS-Vorbehandlung <i>in vivo</i> auf die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Expression von TNF α , IL-1 β und IL-6	44
4.2.2	Einfluss einer längerfristigen LPS-Vorbehandlung <i>in vitro</i> auf die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Expression von TNF α , IL-1 β und IL-6	46
4.2.3	Einfluss einer längerfristigen LPS-Vorbehandlung <i>in vivo</i> auf die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Expression von IL-10.....	50

4.2.4	Einfluss einer längerfristigen LPS-Vorbehandlung <i>in vitro</i> auf die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Expression von IL-10.....	51
5.	DISKUSSION	53
5.1	Veränderte basale Zytokinexpression in Kupfferzellen unter Entzündungsbedingungen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>.....	54
5.1.1	Einfluss einer Entzündung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> auf die basale Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-6 und IL-1 β in Kupfferzellen	54
5.1.2	Einfluss einer Entzündung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> auf die basale Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in Kupfferzellen	57
5.1.3	Einfluss einer Entzündung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> auf die basale Expression von ProstaglandinD ₂ in Kupfferzellen	59
5.2	Veränderte Reaktivität von Kupfferzellen auf kurzfristige LPS-Stimulation unter Entzündungsbedingungen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	60
5.2.1	Einfluss einer Entzündung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> auf die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Expression von TNF α , IL-6 und IL-1 β	60
5.2.2	Einfluss einer Entzündung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> auf die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Expression von IL-10	65
6.	ZUSAMMENFASSUNG	68
	LITERATURVERZEICHNIS.....	71

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.	Schematische Darstellung des Lebergewebes.....	2
Abb. 2.	Schematischer Aufbau der Lipopolysaccharide (LPS) Gram-negativer Enterobacteriaceae.....	4
Abb. 3.	Aufbau der Elutriationseinheit.....	21
Abb. 4.	Quantitative Darstellung (A) und Schmelzkurvenanalyse (B) einer LC-PCR.....	26
Abb. 5.	Basale Expression von TNF α -, IL-1 β - und IL-6-mRNA nach 24 h (5a) und 48 h (5b) – Vergleich von Kontrolltieren mit „LPS-Ratten“.....	31
Abb. 6.	Basale Expression von TNF α - und IL-6-Protein nach 24 h – Vergleich von Kontrolltieren mit „LPS-Ratten“.....	33
Abb. 7.	Basale Expression von TNF α -, IL-1 β - und IL-6-mRNA nach 24-stündiger (7a) und 48-stündiger (7b) LPS-Behandlung in Kontrollratten.....	34
Abb. 8.	Basale Expression von TNF α - und IL-6-Protein nach 24-stündiger LPS-Behandlung in Kontrollratten.....	35
Abb. 9.	Basale Expression von TNF α -, IL-1 β - und IL-6-mRNA nach 24-stündiger (9a) und 48-stündiger (9b) LPS-Behandlung in „LPS-Ratten“.....	36
Abb. 10.	Basale Expression von TNF α - und IL-6-Protein nach 24-stündiger LPS-Behandlung in „LPS-Ratten“.....	37
Abb. 11.	Basale IL-10-mRNA-Expression nach 24 h und 48 h – Vergleich von Kontrolltieren mit „LPS-Ratten“.....	38
Abb. 12.	Basale IL-10-Proteinexpression nach 24 h – Vergleich von Kontrolltieren mit „LPS-Ratten“.....	39
Abb. 13.	Basale Expression von TNF α -, IL-6- und IL-10-Protein in 24-h-Überständen – Vergleich von Kontrolltieren mit „LPS-Ratten“.....	40
Abb. 14.	Basale Expression von IL-10-mRNA (14a) und IL-10-Protein (14 b) nach 24-stündiger sowie basale IL-10-mRNA-Expression nach 48-stündiger LPS-Behandlung in Kontrollratten.....	41
Abb. 15.	Basale Expression von IL-10-mRNA (15 a) und IL-10-Protein (15 b) nach 24-stündiger sowie basale IL-10-mRNA-Expression nach 48-stündiger LPS-Behandlung in „LPS-Ratten“.....	42
Abb. 16.	Basale Expression von ProstaglandinD ₂ nach 24-stündiger und 48-stündiger LPS-Behandlung – Vergleich von Kontrolltieren mit „LPS-Ratten“.....	43
Abb. 17.	Stimulierbarkeit der TNF α -, IL-1 β - und IL-6-mRNA-Expression durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus Kontrollratten und „LPS-Ratten“.....	45
Abb. 18.	Stimulierbarkeit der TNF α - und IL-6-Proteinfreisetzung durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus Kontrollratten und „LPS-Ratten“.....	46
Abb. 19.	Stimulierbarkeit der TNF α -, IL-1 β - und IL-6-mRNA-Expression durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus Kontrollratten nach 24-stündiger LPS-Vorbehandlung.....	47

Abb. 20.	Stimulierbarkeit der TNF α - und IL-6-Proteinfreisetzung durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus Kontrollratten nach 24-stündiger LPS-Vorbehandlung	48
Abb. 21.	Stimulierbarkeit der TNF α -, IL-1 β - und IL-6-mRNA-Expression durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus „LPS-Ratten“ nach 24-stündiger LPS-Vorbehandlung	49
Abb. 22.	Stimulierbarkeit der TNF α und IL-6-Proteinfreisetzung durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus „LPS-Ratten“ nach 24-stündiger LPS-Vorbehandlung.....	49
Abb. 23.	Stimulierbarkeit der IL-10-, TNF α -, IL-1 β - und IL-6-mRNA-Expression durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus Kontrollratten und „LPS-Ratten“	50
Abb. 24.	Stimulierbarkeit der IL-10-Proteinfreisetzung durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus Kontrollratten und „LPS-Ratten“	51
Abb. 25.	Stimulierbarkeit der IL-10-mRNA-Expression durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus Kontrollratten (A) und „LPS-Ratten“ (B) nach 24-stündiger LPS-Vorbehandlung	52

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.	Geräte.....	11
Tab. 2.	Chemikalien und Biochemikalien	12
Tab. 3.	Verbrauchsmaterialien	13
Tab. 4.	Reinigungs- und Nachweissysteme („Kits“)	13
Tab. 5.	Oligonukleotide für die LC-PCR	15
Tab. 6.	Elutrationsschema	22
Tab. 7.	LC-PCR-Protokolle.....	27

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APP	Akut-Phase-Protein
Bp	Basenpaare
C3a	aktiviertes Komplementprotein 3
C5a	aktiviertes Komplementprotein 5
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
E.coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GTP	Guanintriphosphat
HBSS	Hanks´ Balanced Salt Solution (Hanks gepufferte Salzlösung)
HEPES	2-(-4-2-Hydroxyethyl)-Piperazinyl-1-Ethansulfonat
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-13	Interleukin-13
KC	Kupferzellen
kDa	KiloDalton
LBP	LPS-Bindungsprotein
LC-PCR	LightCycler-Polymerase Chain Reaction
LPS	Lipopolysaccharid
mCD-14	Membran-assoziiertes CD 14
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NCS	Newborn Calf Serum (neonatales Kälberserum)
Oligo-(dT)	Oligo-Desoxythymidin
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PGD ₂	ProstaglandinD ₂
PGE ₂	ProstaglandinE ₂

RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RSA	Rattenserumalbumin
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
sCD14	soluble CD14
SEC	Sinusoidale Endothelzellen
SEM	Standard Error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
TGF- β_1	transforming growth factor-beta ₁
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	volume/volume (Volumen pro Volumen)
w/v	weight/volume (Gewicht pro Volumen)

1. Einleitung

1.1 Aufgaben der Leber

Die Leber ist eines der größten Organe des Organismus. Als zentrales Organ des Intermediärstoffwechsels übernimmt sie vielfältige Aufgaben. Ihre besondere Funktion im Intermediärstoffwechsel erklärt sich aus ihrer anatomischen Lage: während der Resorptionsphase erhält sie die über den Intestinaltrakt aufgenommenen Nahrungsstoffe, Vitamine und Elektrolyte und speichert diese zu großen Teilen. In der postresorptiven Phase kann die Leber diese Substrate in den Blutkreislauf abgeben und den anderen Organen und Geweben des Körpers zur Deckung ihres Energiebedarfs zur Verfügung stellen [LÖFFLER und PETRIDES 1998]. Im Einzelnen bedeutet dies die Sicherstellung der Energieversorgung des Organismus durch Speicherung und Freisetzung von Glucose, durch Aminosäure-Katabolismus, Lipid-Prozessierung und Ketonkörper-Synthese. Weiterhin ist die Leber an der Steuerung des Hormonhaushalts beteiligt, indem sie (Pro)-Hormone und Mediatoren synthetisiert und freisetzt, andererseits aber auch inaktiviert [JUNGERMANN und KATZ 1989]. Die Leber ist für die Synthese der meisten Plasmaproteine verantwortlich und beeinflusst über den Auf- und Abbau dieser Proteine das Plasmavolumen, sie unterstützt die Verdauung durch die Produktion und Freisetzung von Gallensäuren, engtief maßgeblich Endo- und Xenobiotika und übernimmt sensorische Funktionen im Energie-, Elektrolyt- und Wasserhaushalt [JUNGERMANN und KIETZMANN 1996].

1.2 Aufbau der Leber

Das Lebergewebe besteht zu 85% der Zellmasse aus Hepatozyten, die die eigentlichen Parenchymzellen darstellen. Diese laufen zu Leberzellbalken geordnet radiär auf die Vena centralis zu, sie sind für organspezifische Aufgaben im Intermediärstoffwechsel verantwortlich. Neben den Hepatozyten existieren mindestens vier Arten von Nichtparenchymzellen, die sich vor allem entlang der blutgefüllten Sinusoide befinden und anatomisch und funktionell in enger Beziehung zu den Parenchymzellen stehen. Zu diesen Nichtparenchymzellen gehören die Sinusoidalen Endothelzellen, die Kupfferzellen, die Perisinusoidalzellen und die Pitzellen (Abb. 1).

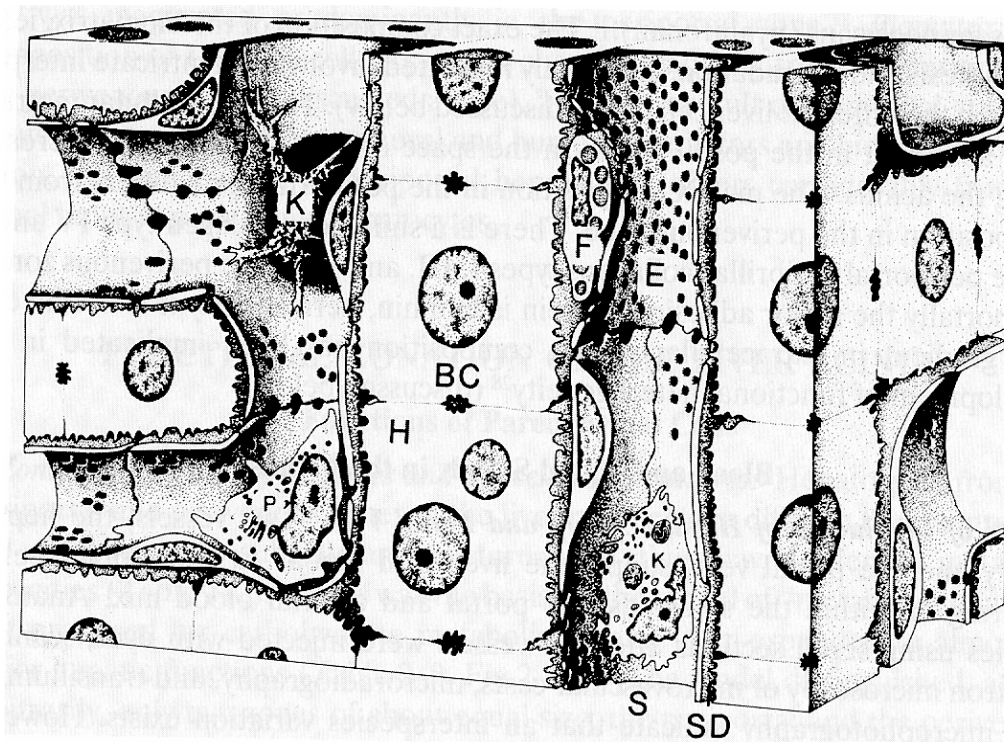


Abb. 1. Schematische Darstellung des Lebergewebes. Das Parenchym besteht aus Zellbalken, die von benachbarten Hepatozyten (H) gebildet werden. Dazwischen liegen die blutgefüllten Sinusoide (S), die von fenestrierten Sinusoidal-Endothelzellen (E) ausgekleidet werden und ihrerseits von „fettspeichernden“ Perisinusoidalzellen (F) umgeben sind. Kupferzellen (K) und Pitzellen (P) ragen in das sinusoidale Lumen hinein. Zwischen den Hepatozyten und den Endothelzellen der Sinuswände befindet sich der Disse'sche Raum (SD), in dem die extrazelluläre Matrix lokalisiert ist. Mit ihrer apikalen Plasmamembran bilden die Hepatozyten die Gallenkanälchen, Canaliculi biliferi (BC) [nach SASSE et al. 1992].

Die Sinusoidalen Endothelzellen (SEC), mit ca. 70% die größte Fraktion der Nichtparenchymzellen, bilden die Wände der Sinusoide und sind im Unterschied zu den vaskulären Endothelzellen fenestriert. Ihre Fenestrae mit einem Durchmesser von 100-200 nm ermöglichen Makromolekülen aus den Sinusoiden freien Zugang zur Hepatozytenoberfläche, halten aber gleichzeitig zelluläre und hochmolekulare Substanzen zurück, so dass sie als Filter zwischen Hepatozyten und Blut fungieren [MÄCK 2001].

Neben den Endothelzellen bilden die Antigen-präsentierenden Kupferzellen (KC) als sessile Makrophagen den Hauptbestandteil des retikuloendothelialen Systems im Organismus [MAC PHEE et al. 1993]. Die KC machen ungefähr 20% der Nichtparenchymzellen aus. Sie liegen innerhalb der sinusoidalen Kapillaren [BURT et al. 1993] und ragen mit ihren zytoplasmatischen Fortsätzen in den Disse'schen Raum, den Kommunikationsort zwischen Parenchym- und Nichtparenchymzellen. Diese Position ermöglicht es ihnen, potentielle Pathogene wie Mikroorganismen, Endotoxine und Immunkomplexe, sowie andere körpereigene oder körperfremde Makromoleküle aus dem Pfortaderblut zu entfernen. Nach Aktivierung können die KC ein weites Spektrum löslicher Mediatoren wie Zytokine, Prostaglandine und reaktive Sauerstoffspezies freisetzen [DECKER 1990].

Weiterer Bestandteil der Nichtparenchymzellen (ca. 10%) sind die Vitamin-A-speichernden Perisinusoidalzellen (Itozellen, hepatische Sternzellen), die sich im Disse'schen Raum befinden. Durch ihre Fähigkeit zur Biosynthese von Matrixkomponenten wie Kollagenen und Proteoglykanen [BOUWENS et al. 1992] können sie eine entscheidende Rolle in der zur Leberzirrhose führenden Leberfibrosierung spielen.

Pitzellen (ca. 1% der Nichtparenchymzellen) sind Leber-assoziierte granuläre Lymphozyten, die natürliche Killerzell-Aktivität besitzen und an der luminalen Oberfläche der Sinusoide angeheftet sind [BURT et al. 1993].

1.3 Beteiligung der Leber an Entzündungsreaktionen

Eine zentrale Funktion der Leber ist ihre Beteiligung an der Immunabwehr, die durch komplexe Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Leberzellen realisiert wird. Die Leber unterstützt dabei sowohl bei lokalen als auch bei systemischen Entzündungen die Abwehrreaktionen. Schädigende Reize wie z.B. bakterielle und virale Infektionen stören die Homöostase des Organismus, so dass verschiedene Abwehrmechanismen in Form von Entzündungsprozessen mit dem Ziel ausgelöst werden, das ursächliche Agens zu beseitigen. Als erstes wird die angeborene oder unspezifische Immunantwort ausgelöst, die den Organismus schützt, bis andere Abwehrsysteme wie das der Lymphozyten aktiviert werden [LÖFFLER und PETRIDES 1998]. Im Zentrum des angeborenen Systems befindet sich das Komplementsystem, das zur humoralen Abwehr gehört und aus hochmolekularen Proteinen in Plasma und Körperflüssigkeiten besteht, die hauptsächlich intrahepatisch von Hepatozyten synthetisiert werden [RAMADORI et al. 1984; ANTHONY et al. 1985]. Die Komplementkomponenten liegen als inaktive Vorstufen vor und können über verschiedene Wege kaskadenförmig aktiviert werden: Antigen-Antikörper-Komplexe initiieren die klassische Aktivierungsstrecke, mikrobielle Oberflächenbestandteile wie Lipopolysaccharide (vgl. 1.3.1) können das Komplementsystem auf einem alternativen Weg aktivieren. Die besondere biologische Bedeutung der alternativen Komplementaktivierung besteht in der sehr schnellen Einleitung von Abwehrmaßnahmen des Organismus gegen pathogene Erreger, ohne dass zuvor Antikörper durch spezifische Immunzellen bereitgestellt werden müssen. Die Leber kann weiterhin auf schädigende Reize über eine vermehrte Glukosefreisetzung, die als Elektronen-Donor für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und/oder als Kohlenstoffquelle im partiell hypoxischen Entzündungsgebiet dient, reagieren. Eine eher längerfristige Abwehrreaktion ist die Akut-Phase-Reaktion der Leber, die unter anderem durch die proinflammatorischen Zytokine (vgl. 1.3.2.3) ausgelöst wird [LÖFFLER und PETRIDES 1998].

1.3.1 Bakterielle Lipopolysaccharide als Auslöser von Entzündungsreaktionen

Lipopolysaccharide (LPS) sind hitzestabile amphiphile Moleküle, die sich aus einer hydrophoben Region - dem Lipoid A - und einem kovalent an diese Membrandomäne gebundenen Heteropoly- oder Heterooligosaccharidanteil zusammensetzen (Abb. 2). Das in der äußeren Bakterienmembran verankerte Lipoid A stellt das endotoxisch aktive Zentrum des LPS dar. Die Polysaccharidregion besteht aus einer terminalen „O-spezifischen Kette“ und einer Kernregion, die an das Lipoid A gebunden ist. Die „O-spezifische Kette“ besteht aus bis zu 50 sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten von 2 – 8 Monomeren und weist eine extrem hohe Strukturvariabilität zwischen verschiedenen Spezies auf, die die Basis für die serologische Klassifizierung individueller Bakterienstämme nach den O-Determinanten bildet [ALEXANDER und RIETSCHEL 1999].

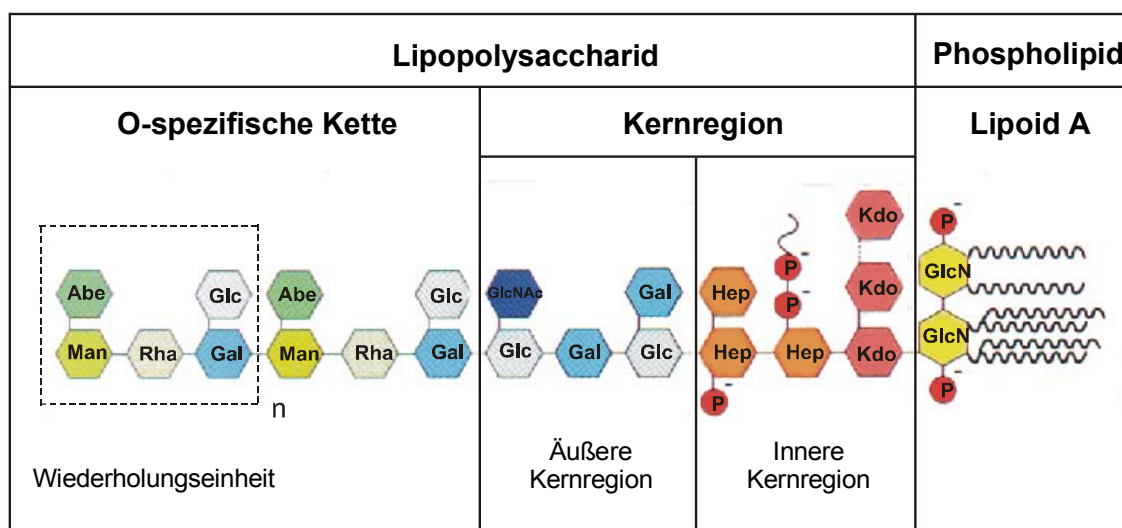


Abb. 2. Schematischer Aufbau der Lipopolysaccharide (LPS) Gram-negativer Enterobacteriaceae. Die in der äußeren Bakterienmembran verankerte Lipoid A-Domäne stellt das endotoxisch aktive Zentrum des LPS dar. Abe: Abequose; Gal: Galaktose; Glc: Glucose; GLcN: Glukosamin; GlcNAc: N-Acetyl-D-Glucosamin; Hep: L-Glycero-D-manno-Heptose; Kdo: 2-Keto-3-deoxyoctulosäure; Man: Mannose; P: Phosphat; Rha: L-Rhamnose [nach ALEXANDER und RIETSCHEL 1999].

Die Lipopolysaccharide, die im Rahmen der angeborenen Immunität eine sehr schnell einsetzende Antikörper-unabhängige Aktivierung der klassischen Komplementkaskade unter Freisetzung der Anaphylatoxine C3a und C5a [ALEXANDER und RIETSCHEL 1999] bewirken, sind Bestandteile der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. In höheren Dosen sind Lipopolysaccharide Auslöser der bedrohlichen pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen von Endotoxämie und gramnegativer Sepsis mit der Gefahr eines Multiorganversagens im septischen Schock [HATAO et al. 2005]. Agonistische LPS-Formen gehören zu den aktivsten biologischen Immunstimulatoren: sie können im Organismus zur Bildung von Antikörpern und endogenen Pyrogenen führen und zusätzlich hämorrhagische Reaktionen sowie die intravasale Gerinnung auslösen [BROCK et al. 1994]. Die Darmmukosa bildet eine effektive Barriere, die die

Translokation nur geringer LPS-Mengen von Darm-assoziierten Gram-negativen Bakterien in die Zirkulation erlaubt. Im peripheren Blut sind daher beim gesunden Menschen lediglich Plasma-LPS-Werte von 3 - 10 pg/ml nachweisbar [ALEXANDER und RIETSCHHEL 1999]. Dieser mit den Nahrungslipiden konstitutiv resorbierte Anteil des gastrointestinalen LPS wird über das Pfortadersystem zur Leber transportiert und dort von KC und SEC durch Endozytose bzw. über den Gallenweg aus der enterohepatischen Zirkulation entfernt [ALEXANDER und RIETSCHHEL 1999; PRAANING-VAN DALEN et al. 1981]. Bei Patienten mit Endotoxinämie [HURLEY 1995], Leberzirrhose [LUMSDEN et al. 1988] oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [GARDINER et al. 1995] werden erhöhte LPS-Spiegel im Blutstrom gefunden. Im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wird ein funktionelles Versagen der Mukosa-Barriere für die erhöhten LPS-Plasmaspiegel verantwortlich gemacht [GARDINER et al. 1995]. Unter pathologischen Bedingungen wie im Rahmen einer Sepsis können im Blutstrom LPS-Spiegel von oft mehr als 400 pg/ml gemessen werden [OPAL et al. 1999].

1.3.2 Rolle der Kupfferzellen während Abwehr und Entzündung

Die sessilen Antigen-präsentierenden KC spielen eine entscheidende Rolle im Rahmen der verschiedenen Abwehrmechanismen der Leber. Sie nehmen die beschriebenen Endotoxine (=Lipopolysaccharide) aus dem Pfortaderblut auf, setzen nach ihrer Aktivierung ein weites Spektrum löslicher Mediatoren wie Zytokine, Prostaglandine und reaktive Sauerstoffspezies frei [DECKER 1990] und modulieren unter anderem über parakrine Wirkungen der Mediatoren die Funktionen der benachbarten Zellen in der Leber [KMIEC 2001].

1.3.2.1 Vermittlung von LPS-Signalen in Kupfferzellen

Lipopolysaccharide interagieren mit ihren Zielzellen über spezifische Rezeptoren in der Zellmembran. In der Zirkulation werden LPS-Aggregate durch ein LPS-Bindungsprotein (LBP), das von Hepatozyten sezerniert wird [SU et al. 1994] opsoniert und zu löslichen (sCD14) oder Glykosyl-Phosphatidylinositol-verankerten membrangebundenen LPS-Rezeptoren (mCD14) transportiert [HAZIOT et al. 1998]. Da mCD14 (55 kDa) keine intrazelluläre Signal-Domäne besitzt [ULEVITCH and TOBIAS 1995], wird das LPS/CD14-Signal durch einen assoziierten Rezeptor der Toll-like-Rezeptor(TLR)-Familie - dem TLR4 [CHOW et al. 1999] - in die Zelle übertragen. Während SEC den putativen LPS-Rezeptor CD14 konstitutiv exprimieren [SCOAZEC and FELDMANN 1994], ist die Expression von CD14 auf KC umstritten. Neben einer konstitutiven CD14-Expression auf KC [IKEJIMA et al. 1999] ist auch eine durch LPS induzierbare Expression gezeigt [TOMITA et al. 1994]. Bei LPS-Konzentrationen >100 ng/ml sind mononukleäre Phagozyten *in vitro* auch auf CD14-unabhängige Weise durch Scavenger-Rezeptoren oder β_2 -Integrine aktivierbar [FENTON and GOLENBOCK 1998]. BELLEZZO et al. postulieren [1996] einen alternativen und sensitiveren Weg der Signaltransduktion für LPS in KC, der auch bei niedrigen LPS-Konzentrationen (<5 ng/ml) eine serum- und damit LBP-unabhängige Aktivierung

erlaubt. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe [MÄCK et al. 2001a] zeigten entsprechend eine durch LPS bereits in einer Konzentration von 1 ng/ml induzierte Expression proinflammatorischer Zytokine in KC in NCS-freiem Medium - und somit Serum-unabhängig, ohne das zur Aktivierung des CD14/TLR4-Komplexes notwendige LBP.

1.3.2.2 LPS-induzierte Reaktionen in Kupferzellen

LPS induziert in KC die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin [MARLETTA et al. 1988; VALATAS et al. 2004], das an der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus beteiligt ist. Unter Mitwirkung weiterer Faktoren löst LPS auch eine verstärkte Synthese reaktiver Sauerstoffspezies, besonders des Superoxidanionradikals O_2^- aus. Dieses Radikal unterstützt die KC in ihrer Wirkung, phagozytierte Organismen zu inaktivieren [BHATNAGAR et al. 1981; BIRMELIN et al. 1986]. LPS induziert in KC weiterhin die Sekretion von Prostanoiden [DECKER 1990]. Die Prostanoiden, zu denen die Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxane gezählt werden, gehören zu den Eicosanoiden, die aus Derivaten der Arachidonsäure gebildet werden. Die KC sind die Hauptproduzenten der Eicosanoide in der Leber [DECKER 1985], das Prostaglandin D_2 (PGD $_2$) ist dabei unter den Prostanoiden das Hauptprodukt der KC [KUIPER et al. 1988]. LPS induziert in KC des Weiteren die Bildung der immunomodulatorischen Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-12 (IL-12) und Interleukin-13 (IL-13) [DECKER 1990; KNOLLE et al. 1995; THOMPSON et al. 1998; VALATAS et al. 2004]. TNF α wird in der Leber fast ausschließlich von den KC gebildet, an der Produktion von IL-6 sind auch andere Zelltypen beteiligt [LUSTER et al. 1994]. Allgemein werden die proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 außer von Makrophagen auch von aktivierten Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und T-Zellen gebildet und zeigen als multifunktionelle Glykoprotein-Botenstoffe pleiotrope Effekte auf eine Vielzahl von Zielzellen. Auch das antiinflammatorische IL-10 wird außer von Makrophagen von verschiedenen Zellarten u.a. von Monozyten, T-Helferzellen (T $_H$ 2-Zellen), Stromazellen und ultraviolett-aktivierten Keratinozyten gebildet [THOMPSON et al. 1998].

1.3.2.3 Funktionen der von den Kupferzellen der Leber freigesetzten Zytokine und Prostanoiden

Die proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 stimulieren in neuroendokrinen Zellen die Glucocorticoid-Freisetzung [HEINRICH et al. 1990] und regulieren die Differenzierung von Neutrophilen und Makrophagen. Des Weiteren sind sie an der terminalen Umwandlung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen beteiligt [HEINRICH et al. 1990; ROITT et al. 1996]. In der Leber führen die proinflammatorischen Zytokine zu einer Induktion der Akut-Phase-Reaktion in Hepatozyten [HEINRICH et al. 1990]. Die Akut-Phase-Reaktion stellt eine frühe und unspezifische, jedoch hoch komplexe Allgemeinreaktion des Organismus auf Störungen der Homöostase infolge von Infektionen, Nekrosen, traumatischen Läsionen oder Tumorwachstum

dar. Das Ziel der Akut-Phase-Reaktion ist es, das ursächliche Agens zu lokalisieren, dessen Ausbreitung durch Gerinnungsaktivierung, Leukozytose, Hormonfreisetzung und metabolische Veränderungen zu verhindern und die normalen Organismusfunktionen wiederherzustellen. Diese koordinierte Reaktionskaskade ist vor allem durch die veränderte Bildung von Plasmaproteinen, den sogenannten Akut-Phase-Proteinen (APP), gekennzeichnet [MÄCK 2001]. IL-6 stimuliert dabei als Hauptmediator ein breiteres und anderes Spektrum an APP als TNF α und IL-1 β [CASTELL et al. 1989]. TNF α und IL-1 β initiierten als weitere Folge einer Entzündung die Expression von Adhäsionsmolekülen auf SEC [SPRINGER 1990; ESSANI et al. 1995; McNAB et al. 1997]. Diese interagieren mit zirkulierenden Leukozyten, bewirken ihre Anheftung und ermöglichen so die Migration in das entzündete Gewebe. Prostanoiden kontrollieren die Funktion von Nichtparenchymzellen über autokrine und parakrine Wirkungen während Homöostase und Entzündung. So erhöhen von KC freigesetzte Prostanoiden die Glykogenolyse in Hepatozyten, so dass Substrate für die inflammatorische Reaktion benachbarter Zellen bereitgestellt werden [FENNEKOHL et al. 1999]. Für das antiinflammatorische ProstaglandinE₂ (PGE₂), das LPS-induziert von KC freigesetzt wird, ist beschrieben, dass es die LPS-induzierte TNF α -Freisetzung unterdrückt [KARCK et al. 1988]. Das unter anderem von den KC der Leber gebildete IL-10 besitzt neben anderen antiinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-4 (IL-4), IL-13 und Transforming Growth Factor-beta₁ (TGF- β ₁) Monozyten und Makrophagen deaktivierende Eigenschaften und greift auf vielfältige Art und Weise regulierend in den Inflammationsprozess ein [THOMPSON et al. 1998]. So hemmt IL-10 in humanen Blutmonozyten die LPS- oder Interferon-gamma-induzierte Produktion von Interleukin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, Interleukin-8 (IL-8), TNF α , Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) und Granulozyten-koloniestimulierendem Faktor (G-CSF) auf dem Transkriptionslevel. Da die Zugabe von monoklonalen neutralisierenden anti-IL-10-Antikörpern die LPS-induzierte Zytokinproduktion erhöht, wird ein hemmender Einfluss von endogen gebildetem IL-10 auf die Zytokinproduktion postuliert [DE WAAL et al. 1991]. In Peritonealmakrophagen der Maus hemmt rekombinantes Maus-IL-10 sowohl die LPS-induzierte TNF α -Produktion als auch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffzwischenprodukten [BOGDAN et al. 1991]. Humanes IL-10 inhibierte in humanen Blutmonozyten sowohl die basale als auch die durch INF-gamma induzierte Expression des Adhäsionsmoleküls „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) [WILLEMS et al. 1994]. Über einen negativen Rückkopplungsmechanismus wird die LPS-induzierte IL-10-mRNA-Expression sowohl in humanen als auch in Mäuse-Kupfferzellen durch das IL-10-Protein autoregulatorisch gehemmt [KNOLLE et al. 1998].

1.3.2.4 Veränderte Zytokin- und Prostanoidexpression unter Entzündungsbedingungen

Lipopolysaccharide spielen als Entzündungsinduktoren - allein oder kooperativ zum Beispiel mit Anaphylatoxinen [MÄCK et al. 2001a] - eine initiale Rolle in der Regulation von hepatischen Abwehrreaktionen. Für Monozyten und Makrophagen, die repetitiv mit LPS behandelt wurden, ist eine „Deaktivierung“ oder „Endotoxintoleranz“ beschrieben [CAVAILLON 1995]. Der Ausdruck

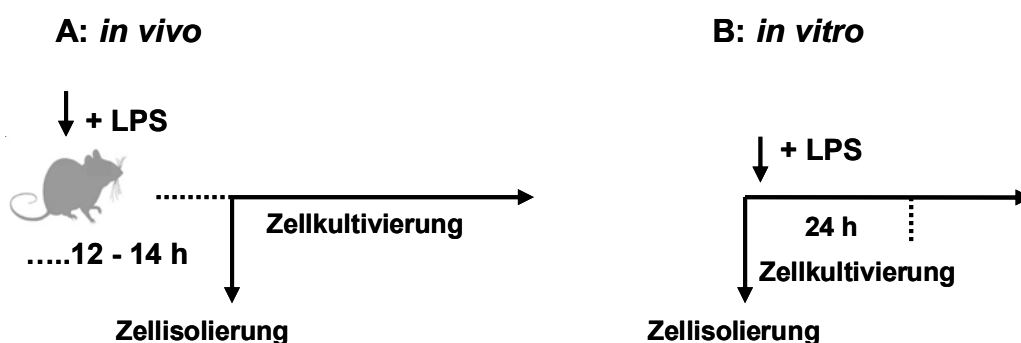
„Endotoxintoleranz“ beschreibt, dass nach repetitiver LPS-Applikation eine abgeschwächte LPS-induzierte Immunantwort beobachtet werden konnte. LPS-induzierte metabolische Veränderungen, die sich im Organismus als Fieber, Entzündung oder Gewichtsverlust äußern, werden abgemildert, ein möglicher letaler Ausgang wird verhindert [CAVAILLON 1995]. Der Schutz ist assoziiert mit einer abgeschwächten LPS-induzierten Zytokinantwort [ERROI et al. 1993; LEHNER et al. 2001], die durch eine verminderte Ansprechbarkeit der Makrophagen bedingt wird [FAHMI and CHABY 1993]. Für Peritonealmakrophagen der Maus ist eine gehemmte LPS-induzierte TNF α - und IL-1 β -mRNA-Expression nach repetitiven i.v.-LPS-Reizen gezeigt [ZUCKERMAN and EVANS 1992]. Eine i.v.-LPS-Gabe induzierte die TNF α -mRNA-Expression in der Leber von „endotoxintoleranten“ Ratten graduell schwächer als in der Leber von Kontrolltieren [FLOHE et al. 1999]. Für kultivierte humane Blutmonozyten von Sepsispatienten ist eine dramatische Abschwächung der durch LPS *in vitro* induzierten IL-6-Produktion im Vergleich zu Monozyten von gesunden Probanden gezeigt [MUNOZ et al. 1991]. Auch periphere Blutmonozyten gesunder Probanden, die LPS i.v. erhalten hatten, reagierten auf einen zweiten *in-vitro*-LPS-Stimulus mit einer deutlich abgeschwächten IL-6-Proteinproduktion [GRANOWITZ et al. 1993]. An Mäusen, die *in vivo* repetitiv LPS erhielten, wurde eine geringere LPS-induzierte IL-6-Proteinproduktion im Serum beobachtet [MENGOZZI et al. 1991]. HAFENRICHTER et al. zeigten [1994], dass ein *in-vitro*-LPS-Reiz in KC aus *in vivo* mit LPS behandelten Ratten das TNF α -Protein schwächer und sowohl das IL-6-Protein als auch das antiinflammatorische PGE₂ stärker stimulierte als in KC aus Kontrollratten. GREWE et al. fanden [1994] keine LPS-induzierte TNF α -mRNA-Expression in kultivierten und mit LPS vorbehandelten KC der Ratte.

1.4 Aufgabenstellung

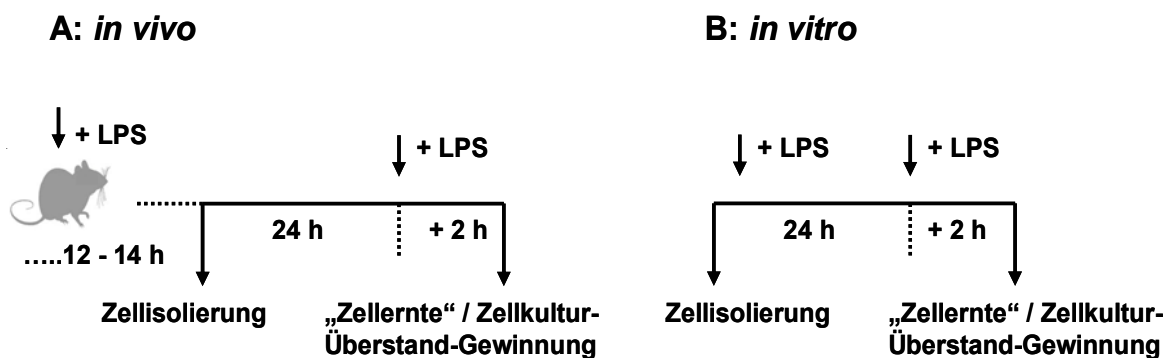
Die KC sind an der unspezifischen Immunantwort und biochemischen Abwehr der Leber unter anderem über die LPS-induzierte Freisetzung immunomodulatorischer Zytokine beteiligt. So wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe der Einfluss von LPS und von rekombinantem Ratten C5a auf die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen gezeigt [MÄCK et al. 2001a]. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass die Simulation von Entzündungsbedingungen durch eine *in-vivo*-Behandlung von Ratten mit LPS eine veränderte Reaktivität der verschiedenen Zelltypen der Leber zur Folge hat. So konnte z.B. in Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine *in-vivo*-LPS-Behandlung von Ratten eine *de-novo*-Expression von Anaphylatoxin-C5a-Rezeptoren in Hepatozyten bewirkt. Dies hatte auch funktionelle Konsequenzen: C5a induzierte in den Hepatozyten eine erhöhte Glukosefreisetzung und vermehrte Akut-Phase-Protein-Synthese auch unabhängig von Prostaglandinen und Zytokinen, die diese Effekte während der Normalsituation vermitteln [KOLEVA et al. 2002]. Die Untersuchungen zu LPS-abhängigen Veränderungen in der Leber sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit fortgeführt werden. So sollte vor dem Hintergrund einerseits der bekannten Stimulierbarkeit der pro- und antiinflamma-

torischen Zytokine durch LPS in KC (vgl. 1.3.2.2) und andererseits des Phänomens der „Endotoxintoleranz“ (vgl. 1.3.2.4) die Mediatorfreisetzung von KC unter Normalbedingungen mit der Freisetzung unter Entzündungsbedingungen verglichen werden.

1. Zuerst sollte untersucht werden, ob sich die basale Zytokinexpression in KC unter Normalbedingungen (d.h. KC aus unbehandelten Kontrollratten) von der basalen Expression unter Entzündungsbedingungen unterscheidet. Die experimentelle Entzündung sollte, wie die Diagramme zeigen, sowohl durch eine *in-vivo*-LPS-Injektion der Ratten (A) als auch durch eine längerfristige LPS-Behandlung der kultivierten KC *in vitro* erzeugt werden (B):



2. Für Monozyten und Makrophagen, die repetitiv mit LPS behandelt wurden, ist eine „Deaktivierung“ oder „Endotoxintoleranz“ beschrieben [CAVAILLON 1995]. Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, ob die durch eine längerfristige LPS-Behandlung *in vivo* und *in vitro* simulierte Entzündungssituation (vgl. 1. der Aufgabenstellung) zu einer veränderten Reaktivität der Zellen auf erneute LPS-Reize führt und ob unter den gewählten Bedingungen eine „Endotoxintoleranz“ in den KC der Rattenleber nachweisbar ist. Hierzu sollten die längerfristig LPS-behandelten KC kurzfristig *in vitro* mit LPS restimuliert und die LPS-induzierte Zytokinexpression bestimmt werden. Ein wichtiger Aspekt hierbei war, dass sowohl die längerfristige (vgl. 1.) als auch die kurzfristige LPS-Behandlung der KC *in vitro* - anders als in anderen Arbeiten - mit einer pathophysiologisch relevanten LPS-Konzentration (vgl. 1.3.1) von 1 ng/ml durchgeführt wurde. Den allgemeinen Versuchsaufbau der kurzfristigen LPS-Restimulation der *in vivo* (A) und *in vitro* (B) mit LPS vorbehandelten KC zeigen die folgenden Diagramme:



Als Messparameter wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl die proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und IL- 1β als auch das antiinflammatorische Zytokin IL-10, das aufgrund seiner Monozyten und Makrophagen deaktivierenden Eigenschaften [THOMPSON et al. 1998] an der Ausbildung einer möglichen „Endotoxintoleranz“ beteiligt sein könnte, bestimmt. Da neben pro- und antiinflammatorischen Zytokinen auch Prostanoiden für die Ausbildung eines Entzündungszustandes verantwortlich sind, sollte auch das von den KC hauptsächlich freigesetzte PGD_2 gemessen werden. Der Nachweis der Zytokine in den KC sollte auf mRNA-Ebene mit quantitativer RealTime-PCR am LightCycler (Fa. Roche), der Nachweis auf Proteinebene mittels Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) erfolgen. Das PGD_2 sollte mit Hilfe eines Radioimmunoassays (RIA) bestimmt werden.

2. Material

2.1 Tiere und Tierhaltung

Die Experimente wurden an männlichen Wistar-Ratten aus der Zucht der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen) durchgeführt. Die Ratten wurden in einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus (Hellphase 7 - 19 Uhr) bei einer Raumtemperatur von 19-23°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% gehalten. Sie hatten freien Nahrungszugang und wurden mit der Rattendiät "Ssniff R-Z" (Fa. "Ssniff" Spezialdiäten GmbH, Soest/Westfalen) aufgezogen. Das Körpergewicht der für die Präparation und anschließende Isolierung von Kupfferzellen verwendeten Ratten lag bei 250 - 350 g.

2.2 Geräte

Tab. 1. Geräte

Gerät	Hersteller	Niederlassung
Begasungsbrutschrank B 5060 EK/O ₂	Heraeus	Hanau
Color Camera HV-C20	Hitachi Denshi	Japan
ELISA-Reader Photometer MR 5000	Dynatech	Eschborn
Elutriations-System - Zentrifuge J2-21M - Elutriations-Rotor JE-6 - Masterflex-Pumpe Modell 7519-20	Beckman Instruments Beckman Instruments Novo direkt	München München Kehl am Rhein
"Gilson Minipuls 2"- Pumpe	Abimed	Düsseldorf
Laborwaagen Sartorius, Typ 2406, 2434	Sartorius	Göttingen
LightCycler	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim
Liquid scintillation counter PW 4700	Raytest	Straubenhardt
Magnetrührer Ika-Combimag RET	Jahnke & Kunkel	Staufen i. Br.
Minishaker MS 2	Heinemann	Duderstadt
pH-Meter, Typ CG 810	Schott	Mainz-Hofheim
Pipetten Typ Finnipette 10, 40, 200, 1000	Labsystems	Frankfurt/ Main
Quarzdestille DESTAMAT Bi 18E	Heraeus	Hanau
Sicherheitswerkbänke: - LaminAir TL 2472 - NUAIRE NU 440-600E	Heraeus Zapf Instrumente	Hanau Sarstedt

Thermocycler TC 2400	Perkin Elmer	Langen
Thermocycler UNO II	Biometra	Göttingen
Vakuumsystem: - Vakuumpumpe Univac - Kühlfalle Unicryo MC 2L-60°C - Zentrifuge Univapo 150 H, beheizbar	Uniequip Laborgerätebau	Martinsried
Wasserbad Typ K2R und NB/S8	Lauda-Werke	Königshofen
Zentrifugen: - Tischzentrifuge EBA 12 - Tischzentrifuge Sigma 3E-1 - Labofuge GL	Hettich Sigma Heraeus	Tuttlingen Osterode Hanau

2.3 Chemikalien und Biochemikalien

Tab. 2. Chemikalien und Biochemikalien

Substanz	Hersteller	Niederlassung
Catalase	Sigma	Deisenhofen
Ciprofloxacin	ICN	Eschwege
DEPC	Sigma	Deisenhofen
Desoxynukleosid-Triphosphat	MBI	Hamburg
Formaldehyd	AppliChem	Darmstadt
HEPES	Roth	Karlsruhe
Lipopolysaccharid (E. coli 026:B6)	Sigma	Deisenhofen
Mercaptoethanol	Merck	Darmstadt
Newborn Calf Serum (NCS)	PAA Laboratories GmbH	Pasching
Nembutal	Serva	Heidelberg
Nycodenz	BioGen Biotech	Eggenstein
Oligo-(dT ₁₂₋₁₈)	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix-UDG	Invitrogen	Carlsbad
RPMI 1640 ohne NaHCO ₃	Biochrom	Berlin

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Darmstadt, oder Serva, Heidelberg, mit dem Reinheitsgrad "p.a." bezogen. Die Gase Carbogen (95% O₂, 5% CO₂ im Verhältnis 19:1), CO₂ und Stickstoff lieferte die Firma Messer-Griesheim, Frankfurt.

2.4 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3. Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller	Niederlassung
24 - well - Platte	Corning	Nürtingen
96 - well - Platte	Greiner	Nürtingen
Braunülen 18 GA	BD Vialon	Heidelberg
Einmal-Injektions-Kanülen und -Spritzen	Braun Melsungen	Melsungen
Einmal-Sterilfilter 0,45 µm	Sartorius	Göttingen
Filter - Tips	nerbe plus	Winsen/Luhe
Gewebekulturschalen 35 mm	Nunc	Wiesbaden
LightCycler capillaries 20 µl	Roche	Mannheim
Nylongaze "Scrynel NY 79 HD"	Zürcher Beuteltuchfabrik	Zürich, Schweiz
Pipettenspitzen	Sarstedt	Nümbrecht
Polypropylenröhrchen steril, 15 ml, 50 ml	Corning	Nürtingen
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Simport	Kanada
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Tropftrichter	Schütt	Göttingen
Tubes 5 ml	Sarstedt	Nümbrecht

2.5 Reinigungs- und Nachweissysteme („Kits“)

Tab. 4. Reinigungs- und Nachweissysteme („Kits“)

Gerät	Hersteller	Niederlassung
ProstaglandinD ₂ (³ H) assay system	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
"Quantikine® M IL-10 Immunoassay" Kit	R&D Systems	Wiesbaden
"Quantikine® M IL-6 Immunoassay" Kit	R&D Systems	Wiesbaden
"Quantikine® M TNFα Immunoassay" Kit	R&D Systems	Wiesbaden
"RNeasy Total RNA" Kit	Qiagen	Hilden

2.6 Enzyme

Kollagenase H

aus Clostridium histolyticum (Roche, Mannheim)

Kollagenase H ist ein Enzymgemisch, welches Bindegewebe auflöst und daher zur Isolierung der darin enthaltenen Zellen verwendet wird.

DNase I

aus Rinderpankreas (Roche, Mannheim)

Während der enzymatischen Gewebedissoziation wird ein Teil der Zellen lysiert und dabei DNA freigesetzt. Makromolekulare DNA kann allerdings ein Verklumpen von Zellen verursachen, woraus Zellverluste resultieren. DNase I baut extrazelluläre DNA ab und hinterlässt als Doppelstrang-spezifische Endonuklease, 5`-Phosphopoly- oder 5`-Phosphodinukleotide.

Pronase E

aus Streptomyces griseus (Merck AG, Darmstadt)

Pronase E, ein Komplex aus verschiedenen Exo- und Endopeptidasen, hydrolysiert Peptidbindungen in Proteinen. Neben der Kollagenase wird Pronase für die Gewebedissoziation bei der Isolierung von Zellen verwendet.

Reverse Transkriptase RevertAid M-MuI V

aus E. coli (MBI Fermentas, Hamburg)

DNA-Polymerase, die einzelsträngige RNA, DNA oder ein RNA-DNA-Hybrid als Matrize zur Synthese eines komplementären DNA-Stranges benutzt.

2.7 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden in Auftragsynthese von der NAPS GmbH, Göttingen, bezogen.

Tab. 5. Oligonukleotide für die LC-PCR

Name		Sequenz
β-Aktin	5' – 3' sense	5' CCC TAA GGC CAA CCG TGA AAA GAT 3'
β-Aktin	3' – 5' antisense	3' AGG TCC CGG CCA GCC AGG TCC AG 5'
TNFα	5' – 3' sense	5' CGG GGG CCA CCA CGC TCT TC 3'
TNFα	3' – 5' antisense	3' TGG GCT ACG GGC TTG TCA CTC G 5'
IL-1β	5' – 3' sense	5' CAG GCT CCG AGA TGA ACA ACA AAA 3'
IL-1β	3' – 5' antisense	3' TGG GGA ACT CTG CAG ACT CAA ACT 5'
IL-6	5' – 3' sense	5' GAT GGA TGC TAC CAA ACT GGA 3'
IL-6	3' – 5' antisense	3' TGG AAA TTG GGG TAG GAA GGA 5'
IL-10	5' – 3' sense	5' CCC AGT CAG CCA GAC CCA CAT 3'
IL-10	3' – 5' antisense	3' CCT GGG GCA TCA CTT CTA CC 5'

2.8 Stammlösungen und Zellkulturmedien

Alle Lösungen, die zum Arbeiten mit RNA verwendet wurden, wurden mit DEPC-Wasser angesetzt. Sie wurden in autoklavierten Glasflaschen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die verwendeten Zellkultur-Medien wurden in entmineralisiertem und Quarz-bidestilliertem H₂O angesetzt, sterilfiltriert und in autoklavierten Glasflaschen bei 4°C aufbewahrt.

H₂O-DEPC

DEPC modifiziert Histidinreste in Proteinen und führt dadurch zur Hemmung von Enzymen, insbesondere von RNasen. DEPC ist gesundheitsschädlich. Beim Autoklavieren wird es jedoch vollständig zersetzt und reagiert mit H₂O unter Hydrolyse zu Ethanol und CO₂.

DEPC	0,1% 1 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

Die Lösung wurde über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert.

Antibiotika-Stammlösung

Ciprofloxacin	0,2 g
0,9%ige NaCl-Lösung	ad 100 ml

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)

NaCl	137 mM	8,000 g/l
KCl	5,365 mM	0,400 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,258 mM	0,185 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,811 mM	0,200 g/l
KH ₂ PO ₄	0,441 mM	0,060 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,337 mM	0,060 g/l
NaHCO ₃	4,166 mM	0,350 g/l
D-Glucose x H ₂ O	5,000 mM	0,991 g/l

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

HBSS ohne NaCl

Ausschließlich für die Herstellung von Nycodenz-Stammlösungen wurde HBSS ohne NaCl verwendet.

Nembutal-Lösung

Nembutal	4% (w/v)	40 g/l
----------	----------	--------

Nycodenz-Dichtegradient-Zentrifugationsmedium:

Nycodenz	28,7% (w/v)	287 g/l
----------	-------------	---------

Nycodenz wurde in HBSS ohne NaCl gelöst, der pH auf 7,4 eingestellt und der Brechungsindex mit einem Refraktometer bestimmt. Die Nycodenzlösung wurde sterilfiltriert und in Aliquots von je 14 ml in Greiner-Zentrifugenröhrchen bei 4°C aufbewahrt.

PBS 10x

NaCl	1,37M	80,062 g/l
KCl	27,0 mM	2,014 g/l
Na ₂ HPO ₄	80,0 mM	11,356 g/l
KH ₂ PO ₄	15,0 mM	2,054 g/l
H ₂ O		ad 1 l

Der pH wurde auf 7,3 eingestellt.

RPMI 1640

Pulvermedium ohne NaHCO ₃		10,42 g/l
HEPES	30 mM	7,12 g/l
NaHCO ₃	24 mM	2,00 g/l
H ₂ O		ad 1 l

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

3. Methoden

3.1 Tierexperimentelle Methoden: LPS-Behandlung *in vivo*

12 – 14 h vor der Zellpräparation wurden den Ratten LPS in einer Dosis von 2 mg LPS/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Das LPS wurde dazu aufgelöst, so dass eine Injektionslösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml entstand. Als Trägermaterial wurde 0,1% Ratten-serumalbumin in 0,9% NaCl verwendet, um eine Anheftung der Stimuli an die Wände der Reaktionsgefäße und der Spritzen zu vermeiden. Vorversuche der Arbeitsgruppe hatten ergeben, dass Placebo-behandelte Tiere (Injektion des entsprechenden Volumens 0,1% RSA in 0,9% NaCl) sich nicht von unbehandelten Kontrolltieren unterschieden.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von Kupfferzellen (modifiziert nach BROWER et al. 1984; EYHORN et al. 1988)

Die Isolierung von KC erfolgte durch einen kombinierten Pronase/Kollagenase-Verdau der Leber. Es folgten Dichtegradientenzentrifugation und zentrifugale Elutriation.

Puffer und Medien:

Präperfusionsmedium

300 ml HBSS mit NaCl

Enzym-Perfusionsmedium I

Pronase E	1,5 g/l	150 mg
HBSS mit NaCl		ad 100 ml

Enzym-Perfusionsmedium II

Kollagenase H	0,286 g/l	20 mg
DNase I	0,014 g/l	1 mg
HBSS mit NaCl		ad 70 ml

Enzym-Inkubationsmedium

Pronase E	1,00 g/l	100 mg
DNase 0,05 g/l	0,05 g/l	5 mg
HBSS mit NaCl		ad 100 ml

Am Tag der Präparation wurden die Enzyme in HBSS gelöst. Der pH-Wert der Medien wurde auf 7,4 eingestellt, anschließend wurden die Lösungen sterilfiltriert und auf 37°C temperiert.

3.2.1.1 Nicht-rezirkulierende *in-situ*-Präperfusion der Rattenleber

Über einen Oxygenator wurden die zur Präparation verwendeten Medien auf 37°C erwärmt. Das Durchflussvolumen während der Perfusion wurde über eine Pumpe reguliert. Durch eine intraperitoneale Injektion von Nembutal in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht wurden die Ratten, deren Körpergewicht im Bereich von 250 – 350 g lag, narkotisiert und anschließend mit Klebeband auf dem Präparationstisch fixiert. Nach Desinfektion der Bauchregion mit 70%igem Ethanol wurde die Bauchhaut entfernt. Das Abdomen wurde mittels einer Längsinzision entlang der Linea alba bis zum Processus xyphoideus eröffnet, so dass der Leberhilus freigelegt und die Vena portae freipräpariert werden konnte. Cranial der Vena lienalis wurde eine Ligatur zum späteren Fixieren der Braunüle locker um die Vena portae gelegt. Mittels einer Braunüle wurde die Vena portae kanüliert. Die Vena cava inferior wurde distal der Venae renales zur Druckentlastung eröffnet. Die nicht-rezirkulierende Perfusion erfolgte mit dem Präperusionsmedium (20 ml/min). Die Braunüle in der Vena portae wurde mit der Ligatur fixiert und die Leber blutleer gespült.

3.2.1.2 Rezirkulierende *ex-situ*-Perfusion

Die Leber wurde aus dem Abdomen herauspräpariert und dann an dem Perfusionsschlauch über einem Tropftrichter aufgehängt. Am Ende der Präperfusion wurde die Leber mit 100 ml Enzym-Perfusionsmedium I, das Pronase E enthielt, bei einer Pumpgeschwindigkeit von 10 ml/min offen perfundiert. Es folgte eine Perfusion der Leber mit 70 ml Enzym-Perfusionsmedium II, das Kollagenase H und DNase I enthielt. Die ersten 30 ml des Mediums wurden nicht-rezirkulierend bei einer Pumpgeschwindigkeit von 10 ml/min, die restlichen 40 ml rezirkulierend bei einer Geschwindigkeit von 20 ml/min über 10 - 15 min durch die Leber perfundiert. Anschließend wurde die Leber in eine sterile Glasschale überführt. Ein Aliquot des Enzym-Inkubationsmediums sowie 200 µl 1 M NaOH wurden hinzugegeben. Dann wurde die Leber zur Ausschwemmung der Zellen in maximal 5 Minuten vorsichtig zerrissen. Das übrige Enzym-Inkubationsmedium wurde zur Zellsuspension hinzugegeben. Anschließend wurde diese Suspension in einem Wasserbad bei 37°C auf einem Magnetrührer gerührt und der pH-Wert kontinuierlich mittels 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt. Nach ca. 10 min wurde die Inkubation, wenn der pH-Wert bei 7,4 stabil blieb, beendet. Mittels einer Filtration durch ein Nylongazesieb (Porengröße 60 µm) wurden bindegewebige Strukturen zurückgehalten. Das Filtrat wurde auf vier sterile 50 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen verteilt und mit kalter HBSS-Lösung aufgefüllt.

3.2.1.3 Separation von Kupferzellen

Die Kupferzellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation und anschließender zentrifugaler Elutriation von den übrigen Zelltypen separiert.

Einstufiger Dichtegradient

Um zunächst die Hepatozyten von den Kupffer- und Endothelzellen abzutrennen, wurde die Zellsuspension 5 min bei 300 rpm und 4°C in der Sigma-Zentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, in vier neue Polypropylen-Röhrchen überführt und das Sediment an Hepatozyten verworfen. Die Zellsuspension wurde dann 10 min bei 1880 rpm und 4°C in der Sigma-Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Resuspendierung der Zellen erfolgte in HBSS. Nach Vereinigung der Zellsuspensionen in zwei Röhrchen, wurden diese mit HBSS aufgefüllt und erneut 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt. Falls es notwendig war, wurde 1 mg DNase I hinzugegeben. Die Zellen wurden mit HBSS auf 10 ml aufgefüllt und dann mit 14 ml Nycodenz-Lösung in einer Konzentration von 28,7% vermischt, so dass eine Endkonzentration von 16,74% Nycodenz entstand. Dann wurden je 12 ml HBSS in zwei 30 ml Corex-Zentrifugenröhrchen gegeben und mit jeweils 12 ml der Zellsuspension mittels einer Spritze unterschichtet. Der Gradient wurde 18 min bei 3300 rpm und 4°C in der Sigma-Zentrifuge zentrifugiert. An der Grenzschicht zwischen Nycodenz und HBSS bildete sich die Interphase, die die Kupffer- und Endothelzellen enthielt. Diese wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in ein steriles 50 ml Polypropylen-Röhrchen gegeben. Zur Resuspendierung der Zellen wurden 50 ml RPMI 1640 verwendet. Diese Suspension wurde 10 min bei 1880 rpm und 4°C in der Sigma-Zentrifuge sedimentiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellsedimente wurden in 5 ml RPMI 1640 resuspendiert und für die nachfolgende zentrifugale Elutriation in eine sterile Spritze aufgezogen.

Zentrifugale Elutriation

Die zentrifugale Elutriation dient der Trennung unterschiedlicher Zellarten. Dabei wirken zwei gegeneinander gerichtete Kräfte auf die Partikel in der Trennkammer. Dies sind die Zentrifugalkraft, die durch die Rotationsgeschwindigkeit beeinflussbar wird, und die entgegengesetzt wirkende zentripetale Flussgeschwindigkeit, die durch eine vorgeschaltete Pumpe regulierbar ist. Die Position der Zellen wird im Gleichgewicht der Kräfte innerhalb der Trennkammer (Abb. 3) durch die folgenden Parameter beeinflusst:

- die Stärke der Zentrifugalkraft und die Winkelgeschwindigkeit (ω) der Zentrifuge
- die zentripetale Flussrate (F), Viskosität (η) und Dichte (ρ_m) des Elutriationsmediums, das durch die Kammer gepumpt wird und den Gegenfluss erzeugt
- Durchmesser (d) [Größe und Form] und Dichte (ρ_p) der zu trennenden Zellen
- die radiale Position (r) der Zellen als Abstand von der Rotationsachse
- die Geometrie der Trennkammer, d.h. der Querschnittsfläche (A) als Funktion vom Radius.

Von diesen Parametern ist die Sedimentationsgeschwindigkeit (V) der zu trennenden Zellen wie folgt abhängig (Gesetz von Stokes): $V = F / A = [d^2 (\rho_p - \rho_m) / 18 \eta] \omega^2 r$

Mittels einer Änderung der Flussgeschwindigkeit erfolgt die selektive Eluierung der entstandenen Zellschichten. Die Zellschichten entstehen, weil die Zellen aufgrund unterschiedlicher Sedimentationsraten der einzelnen Zelltypen an unterschiedlichen Positionen der Kammer dem Gleichgewicht der Kräfte unterliegen.

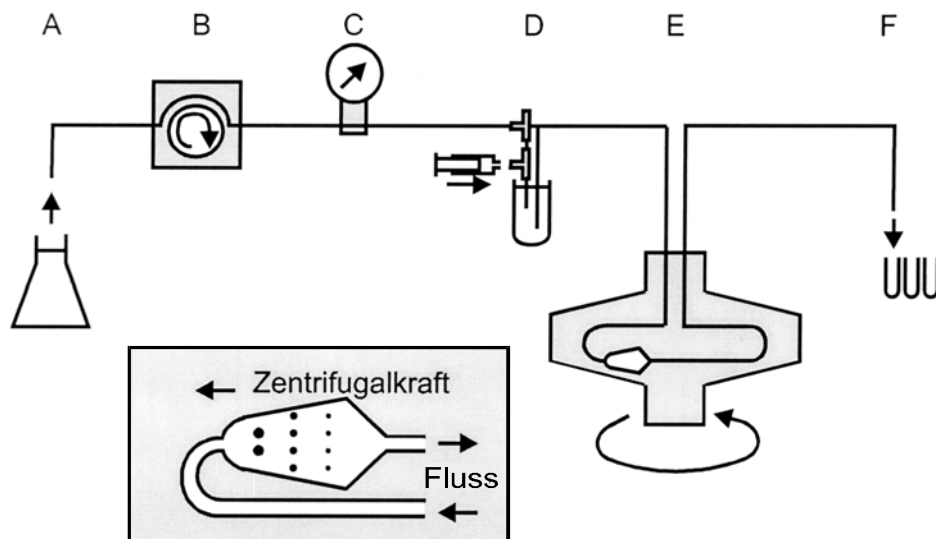


Abb. 3. Aufbau der Elutriationseinheit. Das Medium wird aus dem Vorratsgefäß (A) durch eine Pumpe (B) bei Beobachtung des Drucks (C) über eine „Blasenfalle“ (D) in die Kammer der Elutriationszentrifuge (E) geleitet. Die Suspension mit den zu trennenden Zellen wird über ein 3-Wege-Ventil in die „Blasenfalle“ injiziert. Die Zellfraktionen werden nach der Elutriation in Zentrifugationsröhrchen gesammelt (F). Auf die in der Trennkammer befindlichen Zellen (siehe Vergrößerung), wirken zwei entgegengesetzt gerichtete Kräfte: die durch die Rotationsgeschwindigkeit beeinflusste Zentrifugalkraft und die durch eine Pumpe regulierbare Flussgeschwindigkeit. Die Zellen ordnen sich bei konstanter Zentrifugal- und Zentripetalkraft entsprechend ihrer Größe, Form und Dichte in der Trennkammer an. Durch Erhöhung der Flussgeschwindigkeit werden die einzelnen Zellfraktionen selektiv eluiert, wobei langsamer sedimentierende Zellen die Trennkammer zuerst verlassen. [nach MÄCK 2001, S. 31]

Die Elutriationszentrifuge wurde mit 6% H_2O_2 , Quarzwasser und Catalaselösung (45 mg Catalase, ad 150 ml RPMI 1640) und anschließend mit Quarzwasser gespült. Dann wurde das Elutriationsmedium (RPMI/ 1% NCS/ 1% Antibiotikum) in das System eingeleitet und die Eichung auf die benötigten Flussgeschwindigkeiten bei 875 g (2500 rpm) durchgeführt.

Die im Elutriationsmedium suspendierten Zellen wurden über das Injektionsventil des Elutriators mit Hilfe einer sterilen Spritze bei einer Pumpgeschwindigkeit von 12, 5 ml/min in die Blasenfalle überführt. Das nachfolgende Elutriationsschema zeigt, wie die Separation von KC und SEC aus der Trennkammer des Systems bei einer Rotorgeschwindigkeit von 875 g (2500 rpm) durch eine Erhöhung der Flussrate F erzielt werden konnte:

Tab. 6. Elutriationsschema

Pumpgeschwindigkeit [ml/min]	Elutriationsvolumen [ml]	Elutrierter Zelltyp
12,5	300	Erythrozyten, Leukozyten, Zelltrümmer
18,0	100	SEC
20,0	100	SEC
26,0	50	SEC + KC
35,0	100	KC
38,0	50	KC
40,5	50	KC
42,0	50	KC

Erythrozyten, Leukozyten und Zelltrümmer wurden über die ersten 300 ml der Elutriationslösung aus der Kammer bei einer Pumpgeschwindigkeit von 12,5 ml/min eluiert. Es folgten die SEC-Fractionen sowie eine Mischfraktion aus Endothel- und Kupfferzellen. Über eine weitere Erhöhung der Pumpgeschwindigkeit konnte die gewünschte KC-Fraktion eluiert und in sterilen 50 ml Polypropylenröhrchen aufgefangen werden. Nach einer Zentrifugation über 10 min bei 4°C und 1880 rpm wurden die KC in 5 ml RPMI 1640 resuspendiert.

Bestimmung der Zellzahl

Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:100 mit Medium verdünnt. Anschließend wurde die Mischung in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und die Zellzahl berechnet.

3.2.2 Zellkultivierung - Monokultur von Kupfferzellen

Zellkulturmedium

Zellkulturmedium RPMI 1640 supplementiert mit

NCS 20,0% (v/v)

Antibiotikastammlösung 0,5% (v/v)

Die Kupfferzellen ($4,5 \cdot 10^6$ für Zellkulturschalen, $0,9 \cdot 10^6$ für 24-Loch-Platten) wurden in je 1,5 ml des Kulturmediums auf Zellkulturschalen ($\varnothing = 35$ mm) oder in je 400 μ l des Kulturmediums pro Loch der 24-Loch-Platten ($\varnothing = 16$ mm) ausplattiert und im Begasungsbrutschrank in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 16% O₂, 5% CO₂ und 79% N₂ bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde täglich gewechselt, ein zusätzlicher Mediumwechsel 4-6 h nach der Ausplattierung der Zellen wurde im Rahmen der *in-vivo*-Versuche durchgeführt. Der NCS-Gehalt des Mediums wurde während der Kultivierung von 20% NCS am Präparationstag über 10% NCS an den folgenden

Tagen bis auf 0% NCS am jeweiligen Versuchstag reduziert. Im Rahmen der *in-vivo*-Versuche wurden auch Versuche nach 24-stündiger Kultivierung, d.h. in Medium, das 10% NCS enthielt, durchgeführt. In Vorversuchen hatten sich für KC, die in NCS-freiem Medium bzw. mit 10% NCS versetztem Medium kultiviert wurden, keine Unterschiede bzgl. der Zytokin-mRNA-Expression gezeigt.

3.2.3 Zellkulturexperimente

Die Zellen wurden kultiviert und wie jeweils bei den Einzelexperimenten angegeben mit LPS stimuliert. Dabei müssen zwei grundsätzlich verschiedene *in-vitro*-Stimulationsansätze unterschieden werden:

- eine langfristige, d.h. 24-stündige bzw. 48-stündige LPS-Behandlung zur Simulation der Entzündungsbedingungen (langfristige LPS-(Vor)Behandlung)
- eine kurzfristige LPS-(Re)Stimulation über 2 h (kurzfristiger LPS-Reiz)

LPS wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in sterilem PBS oder bidestilliertem H₂O gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

3.2.3.1 Gewinnung von Kupferzellen zur Gesamt-RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die Zellen wurden zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten in 600 µl Lysis-Puffer des RNeasy-Kits von den Zellkulturschalen abgekratzt. Gesamt-RNA wurde isoliert (vgl. 3.3.1) und anschließend wurde aus der isolierten Gesamt-RNA cDNA (vgl. 3.3.2) synthetisiert, um die mRNA-Expression mittels LightCycler-PCR zu bestimmen (vgl. 3.3.3).

3.2.3.2 Gewinnung von Zellkulturüberständen

Zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten (2 h und 24 h) wurden Aliquots der Zellkulturüberstände abgenommen und bis zur Protein-/ Prostaglandinbestimmung bei -20°C aufbewahrt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Kupferzellen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde das „RNeasy Total RNA“ Kit der Firma Qiagen entsprechend den Herstellerangaben verwendet. RNA-Moleküle mit mehr als 200 Basen binden im Rahmen dieser Isolierungsmethode selektiv an eine Silica-Gel-Membran in einer Säule. Das Kulturmedium wurde von den Gewebekulturschalen abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von Lysis-Puffer, der β-Mercaptoethanol enthielt, aufgeschlossen. Auf die Zellkulturschalen wurden 600 µl, auf die 24-Loch-Platte jeweils 300 µl des Lysis-Puffers pro Loch der Lochplatte gegeben. Die Zelllysate wurden auf spezielle „Shredder“-Säulen gegeben und bei 25200 g (14000 rpm) für 2 min zentrifugiert. Die Lysate wurden dadurch von groben Verunreinigungen und Proteinen befreit und homogenisiert. Die Filtrate wurden mit dem gleichen Volumen (600 µl) an 70%igem Ethanol,

welcher auf -20°C gekühlt war, durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und dann auf die RNeasy-Säulen gegeben. Durch den Ethanol-Zusatz wurde die RNA gefällt und anschließend in zwei Schritten auf die „Silica-Gel-Säulen“ aufgetragen. Die Säulen wurden bei 9200 g (8460 rpm) über 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde jeweils verworfen. Es folgten drei Waschschriffe mit anschließender Zentrifugation zur Reinigung der gebundenen RNA, wobei das Eluat immer verworfen wurde. Die verwendeten Waschpuffer enthielten Guanidinisothiocyanat, welches RNasen inaktiviert. Im abschließenden Isolierungsschritt wurde die RNA mit $30\text{ }\mu\text{l}$ RNase-freiem H_2O von der Säule eluiert. Die isolierte RNA wurde abschließend entweder in der Vakuumzentrifuge getrocknet und dann in $11\text{ }\mu\text{l}$ DEPC-Wasser aufgenommen oder direkt für die cDNA-Synthese eingesetzt.

3.3.2 Synthese von cDNA

Die Reverse Transkriptase (RT) RevertAid M-MUL V ist eine retrovirale Polymerase und synthetisiert im Rahmen der cDNA-Synthese cDNA-mRNA-Hybride. Oligo-(dT₁₂₋₁₈)-Oligonukleotide lagern sich als Primer an die Poly(A)-Sequenzen an den 3'-Enden der mRNA-Moleküle an, die aus der Gesamt-RNA isoliert werden sollen. Die einzelsträngigen mRNA-Stränge dienen der retroviralen Polymerase dabei als Matrize zur Synthese der komplementären DNA (cDNA). In der sich anschließenden PCR (vgl. 3.3.3) werden die entstandenen cDNA-mRNA-Hybride durch eine thermostabile Polymerase amplifiziert.

Reagenzien und Puffer für die cDNA-Synthese

5 x Erststrang-Puffer

Tris-HCl	250 mM
MgCl ₂	20 mM
KCl	250 mM
DTT	50 mM
	pH 8,3

Der Puffer wurde vom Hersteller der Reversen Transkriptase geliefert.

dNTP- Mix

dATP (10 mM)	1 mM	10 μl
dGTP (10 mM)	1 mM	10 μl
dCTP (10 mM)	1 mM	10 μl
dTTP (10 mM)	1 mM	10 μl
DEPC-H ₂ O		ad 100 μl

Zur cDNA-Synthese wurden entweder 11 µl des Gesamt-RNA-Lysats eingesetzt oder der RNA wurde nach dem Eindampfen 11 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben und das Lysat dann verwendet. 1 µl Oligo-(dT₁₂₋₁₈) (500 µg/ml) wurde zu der Suspension gegeben. Diese Mischung wurde für 5 min bei 70°C inkubiert, um Sekundärstrukturen innerhalb der RNA zu denaturieren. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis schockgekühlt. Nach Zugabe von 4 µl Erststrang-Puffer, 2 µl 10 mM dNTP-Mix und 0,5 µl RNase-Inhibitor wurde der Ansatz über 2 min bei 37°C präinkubiert. Es folgte die Zugabe von 1µl (200 U) der Reversen Transkriptase RevertAid M-MUL V. Die reverse Transkriptionsreaktion wurde im Thermocycler mit den folgenden Inkubationszeiten durchgeführt:

- 90 min bei 42°C
- 15 min bei 70°C

Die synthetisierten cDNA-mRNA-Hybride wurden bei -20°C aufbewahrt.

3.3.3 PCR (Polymerase chain reaction)

Die Technik der PCR wird für die selektive Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen verwendet. Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt wird dabei durch zwei Oligonukleotide (Primer), die zu jeweils einem der beiden DNA-Stränge komplementär sind, flankiert. Für eine PCR werden eine ausreichende Menge der vier Desoxynukleosid-Triphosphate und eine hitzebeständige DNA-Polymerase benötigt. Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei sich wiederholenden Schritten und zwar der Denaturierung, dem Anheften der Primer sowie der Extension zu neuen Doppelsträngen. Der Zyklus beginnt mit der Denaturierung des cDNA-mRNA-Hybrid-Doppelstranges zu Einzelsträngen bei einer Temperatur von 95°C (Initial denaturation). Die entstehenden Einzelstränge dienen als Matrize (Template) für die DNA-Synthese. Nach Abkühlen des Reaktionsansatzes auf die jeweils optimierte Bindungstemperatur lagern sich die Primer an (Annealing). Von den Primern ausgehend werden dann die komplementären DNA-Stränge in 5'-3'-Richtung synthetisiert (Primer extension). Dieser Zyklus wird 20- bis 40-mal wiederholt, wobei sich nach dem dritten Zyklus die zu amplifizierenden DNA-Doppelstränge ausbilden. Im Rahmen der Wiederholung des Zyklus nehmen die DNA-Moleküle exponentiell zu. Abschließend werden unvollständig verlängerte cDNA-Produkte beim Temperaturoptimum der Taq-Polymerase (72°C) ergänzt (Final extension).

3.3.3.1 Quantifizierung von mRNA mittels LightCycler Polymerase Chain Reaction (LC-PCR) und Schmelzkurvenanalyse

Der LightCycler besteht aus einem Thermocycler, der mit einem Fluorimeter gekoppelt ist. Er ermöglicht eine Quantifizierung der Gen-Expression durch Detektion der Reaktionskinetik in Echtzeit ("real-time PCR"). Auch die qualitative Identifizierung des Amplifizierungsprodukts ist durch eine DNA-Schmelzpunktanalyse möglich.

Die LightCycler-PCR im sog. "SYBR-Green-Format" beruht darauf, dass sich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I an die kleine Furche der DNA-Doppelhelix anlagert. Die Fluoreszenz wird durch diese Bindung verstärkt. Das bedeutet, dass die Fluoreszenzsignale initial nach der Denaturierung der DNA sehr klein ausfallen, da die DNA einzelsträngig vorliegt. Mit der Ausbildung von doppelsträngigen DNA-Molekülen im Rahmen des weiteren PCR-Zyklus (Annealing und Elongation) steigt die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge des gebildeten doppelsträngigen PCR-Produkts an. Die Kopienzahl der nachzuweisenden Sequenz in der Zelle ist desto größer, je früher (d.h. geringe Zykluszahl) der exponentielle Anstieg der Fluoreszenzintensität erfolgt (Abb. 4A). Die Messung der Fluoreszenzsignale erfolgt jeweils am Ende der Elongationsphase bei 530 nm. In jedem Zyklus wird dann die Menge des Amplifizierungsprodukts dargestellt. Da diese Form der Analyse nicht zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimeren bzw. kleineren Amplifizierungs-Artefakten differenziert, muss das gewünschte PCR-Produkt anhand der Schmelzkurvenanalyse nachgewiesen werden. Dies ist möglich, da die charakteristische Schmelztemperatur des spezifischen Amplifizierungsprodukts höher liegt als die Schmelztemperatur der Primer-Dimere oder Artefakte (Abb. 4B).

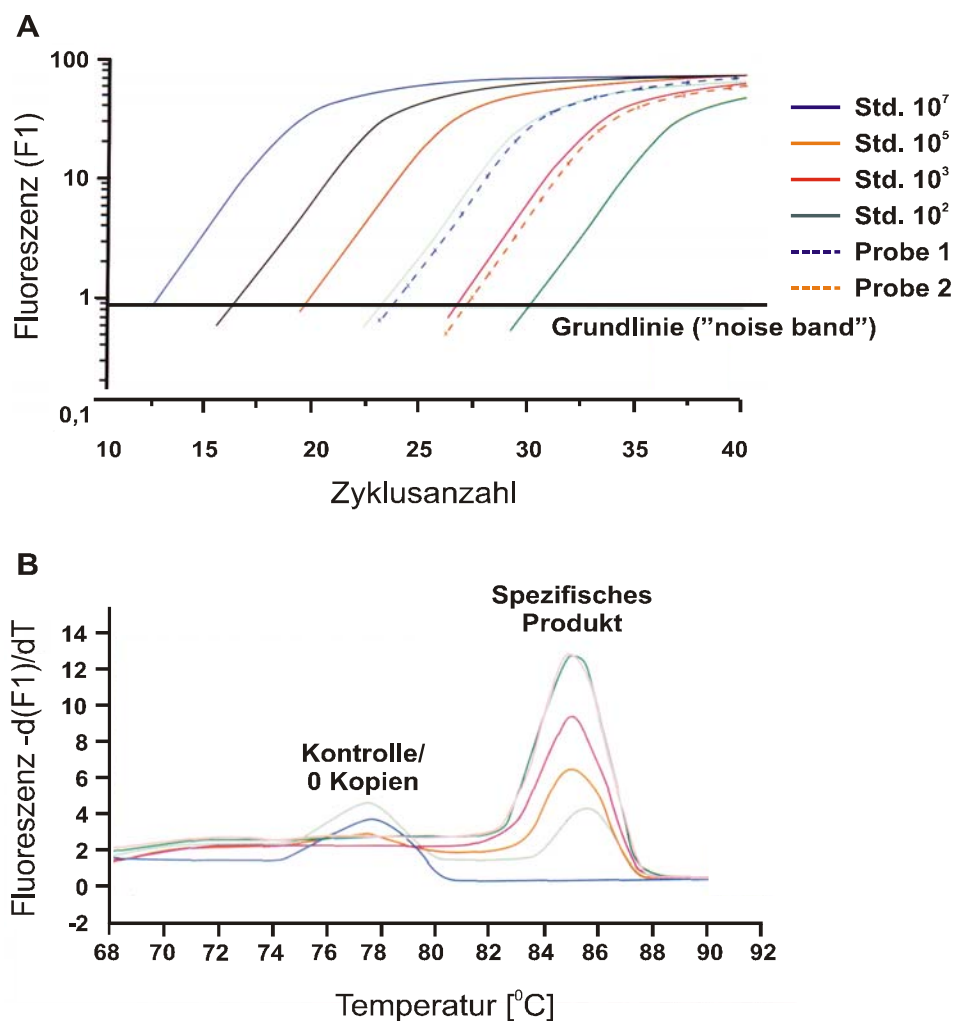


Abb. 4. Quantitative Darstellung (A) und Schmelzkurvenanalyse (B) einer LC-PCR. Erläuterungen s. Text; Std., Standard. [nach MÄCK 2001, S. 49].

Der Reaktions-Mix (10 µl) der LC-PCR enthielt 0,2 µM sense bzw. antisense Oligonukleotid-Primer für β-Aktin, IL-10, IL-6, TNFα und IL-1β (vgl. Tab. 5) und 2 x Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix-UDG. Als Standards der LC-PCR dienten gereinigte PCR-Produkte (IL-6, IL-1β, TNFα und IL-10) sowie ein cDNA Fragment, das in pUC57 (β-Aktin) einkloniert war. Auf die initiale Denaturierung für 120 s bei 95°C folgte eine 40-malige Wiederholung des PCR-Zyklus, der jeweils aus Denaturierung, Primer-Annealing, Elongation und Fluoreszenz-Messung bestand.

Tab. 7. LC-PCR-Protokolle

Produkt [bp]	MgCl ₂	PCR-Protokoll
β-Aktin 220	3 mM	5 s 94°C, 10 s 61°C, 13 s 72°C, 0 s 84°C
IL-6 221	3 mM	5 s 94°C, 10 s 55°C, 14 s 72°C, 0 s 75°C
IL-1β 332	3 mM	5 s 94°C, 10 s 55°C, 18 s 72°C, 0 s 81°C
TNFα 157	3 mM	5 s 94°C, 10 s 59°C, 10 s 72°C, 0 s 81°C
IL-10 193	3 mM	5 s 84°C, 10 s 61°C, 12 s 72°C, 0 s 81°C

Das Produkt wurde identifiziert indem die produktspezifische Schmelztemperatur ermittelt wurde. Die Proben wurden dazu im Schmelzkurvenanalyse-Programm mit einer Geschwindigkeit von 0,2°C/s auf 95°C erhitzt. Während dieses Vorgangs wurde kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen.

Die Schmelztemperatur des spezifischen Produkts mit hoher Kopienzahl konnte anhand der ersten Ableitung der Schmelzkurven als höchster Punkt der Gauß-Kurve bestimmt werden. Darüber hinaus wurde der Schmelzbereich zur Hintergrundkorrektur eingegrenzt (Abb. 4B). Kontrollproben (0 Kopien) oder Proben mit geringer Kopienzahl zeigen entsprechend ein Temperaturprofil, das breit und flach verläuft, das Temperaturmaximum liegt dann im niedrigen Bereich.

Anhand der "Data Analysis software" (Fa. Roche) wurde die Kopienzahl des Zielmoleküls durch logarithmische Auftragung der Fluoreszenz gegen die Zykluszahl kalkuliert (Abb. 4A). Die Grundlinie ("noise band") wurde manuell so gesetzt, dass sie die Grenze zwischen Hintergrund-Fluoreszenz und auswertbaren Daten darstellte. Es wurde eine imaginäre Gerade an die Messpunkte im logarithmisch-linearen Bereich der sigmoiden Kurven gelegt. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der sog. "crossing line" wurde als Kreuzungspunkt bezeichnet, wobei die „crossing line“ meistens an der gleichen Position wie die zuvor gesetzte "noise band" lag. Zur Quantifizierung wurde eine Standardkurve erstellt, indem die Kreuzungspunkte der mitgeführten Standards gegen die bekannten Konzentrationen der Standard-Proben aufgetragen wurden. Die Quantifizierung der unbekannt Proben erfolgte anhand dieser Standardgeraden, wobei die berechneten Werte als "calculated copies" aufgelistet wurden.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)

Die quantitative Bestimmung von Ratten-IL-6 in Zellkulturmedien von KC erfolgte mit dem „Quantikine® M IL-6 Immunoassay Kit“, dessen Nachweisgrenze im Bereich von 31,2-2000 pg/ml liegt. Zur Quantifizierung von Ratten-TNF α wurde das „Quantikine® M TNF α Immunoassay Kit“ eingesetzt, mit dem Ratten-TNF α in einem Meßbereich von 12,5-800 pg/ml nachgewiesen werden kann. Die quantitative Bestimmung von Ratten-IL-10 erfolgte mit dem „Quantikine® M IL-10 Immunoassay Kit“, der Messbereich liegt bei 31,2–2000 pg/ml. Die ELISAs, sogenannte Festphasen-„Sandwich“-ELISAs, die jeweils auf dem gleichen Testprinzip beruhen, wurden den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

In Vertiefungen einer Mikrotiterplatte, deren Oberfläche mit einem spezifischen Antikörper gegen Ratten-IL-6, Ratten-TNF α oder Ratten-IL-10 beschichtet war, wurden Aliquots der Zellkulturmedien gegeben. Während der ersten Inkubationsphase - 2 h bei Raumtemperatur - band das Antigen der Proben und mitgeführten Standards an diesen Antikörper. Nach mehrmaligem Waschen wurde ein zweiter Enzym(Peroxidase)-markierter polyklonaler Antikörper hinzugegeben, der ein anderes Epitop des bereits als Antigen-Antikörper-Komplex vorliegenden Antigens erkennt. Während der folgenden Inkubation – wiederum 2 h bei Raumtemperatur - bildeten sich daher Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe nach dem „Sandwich“-Prinzip aus. Durch mehrmaliges Waschen wurden die freien markierten Antikörper entfernt. Anschließend wurde die Substratlösung (Tetramethylbenzidin [TMB] und stabilisiertes Hydrogenperoxid [H₂O₂]) hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Unter der katalytischen Einwirkung der Peroxidase oxidiert H₂O₂ das farblose TMB zum stabilen blauen TMB-Radikal-Kation. Diese Enzymreaktion wurde nach Ablauf einer 30-minütigen Inkubationszeit durch Zugabe der Stopplösung (Schwefelsäure) gestoppt, wobei die Farbe des Produktes von blau nach gelb wechselt.

Die Intensität des gebildeten Farbproduktes ist direkt proportional zur Zytokinproteinkonzentration in den Standards und Proben, sie konnte als Extinktion bei 450 nm gegen das Chromogensubstrat TMB im ELISA-Reader bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte über eine Standardkurve, die durch Analyse von Standards bekannter Konzentrationen erstellt wurde.

3.4.2 Radioimmunoassay (RIA)

Die in den Medien der Zellversuche enthaltenen PGD₂-Konzentrationen wurden im RIA (Amersham Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben, jedoch im halben Ansatz bestimmt. Die Nachweisgrenze des RIA liegt zwischen 3,1 und 200 pg/tube.

Das Prinzip beruht auf der Konkurrenz des PGD₂ der Probe mit dem radioaktiv markierten PGD₂ des Tracers, welcher der Probe zugesetzt wird, um die nur in begrenzter Anzahl vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper des Antiserums. Somit ist die Menge des an Antikörper gebundenen ³H-PGD₂ umgekehrt proportional zum PGD₂-Gehalt der Probe.

Die nicht an Antikörper gebundenen Liganden werden an Dextran-beschichtete Holzkohle gebunden und nach Zentrifugation im Sediment zurückgehalten. Im Überstand befindet sich demnach nur noch PGD₂, welches an Antikörper gebunden ist. Durch Bestimmung der Radioaktivitätsmenge (³H-PGD₂) im Szintillationszähler kann der PGD₂-Gehalt der Probe errechnet werden (s. u.).

Durchführung

Die Proben wurden nach Zugabe von Tracer, Antiserum und Assaypuffer bei 4°C über Nacht inkubiert. Ebenso wurden die Standards, die jeweils eine definierte Menge PGD₂ enthielten, behandelt. Am folgenden Tag wurden die Proben für 10 min ins Eiswasserbad gestellt, mit der Holzkohle-Suspension versetzt, sofort gevortext und dann erneut 10 min im Eiswasserbad inkubiert. Anschließend wurde das ungebundene PGD₂ durch 10-minütige Zentrifugation bei 2000 g (3300 rpm) in der Sigma 3E-1-Zentrifuge abgetrennt. Anschließend wurden 350 µl des Überstandes mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit vermischt und die Radioaktivitätsmenge im Szintillationszähler bestimmt. Gleichzeitig wurde die Gesamt-Radioaktivität (total count „TC“, d.h. ohne Probe, Antiserum und Kohle), die unspezifische Bindung (non specific binding „NSB“, d.h. ohne Probe und Antiserum) und der Nullstandard („B0“, d.h. mit Antiserum, ohne Probe) ermittelt.

Auswertung

Die gemessenen Werte der Standards und Proben wurden wie folgt in %B/B0-Werten angegeben:
$$\%B/B0 = 100 \cdot (B \text{ (Standard oder Probe)} - \text{NSB}) / (B0 - \text{NSB})$$

Mit den %B/B0-Werten der Standards wurde auf halblogarithmischem Papier die Standardkurve aufgetragen und daraus die PGD₂-Konzentrationen der Proben abgelesen.

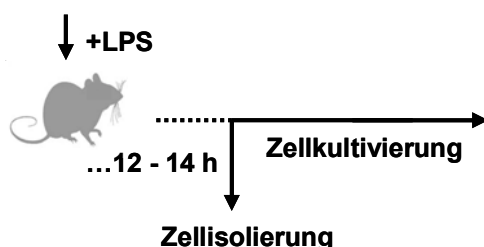
3.5 Statistische Auswertung

Alle quantitativ erhobenen Daten wurden als absolute oder relative Werte ± SEM (standard error of the mean) aller durchgeführten Versuche dargestellt. Für die statistische Analyse wurden die jeweiligen Gruppen mittels Student's t-Test für gepaarte bzw. ungepaarte Proben verglichen und von einem p-Wert ≤ 0,05 an als signifikant unterschiedlich betrachtet.

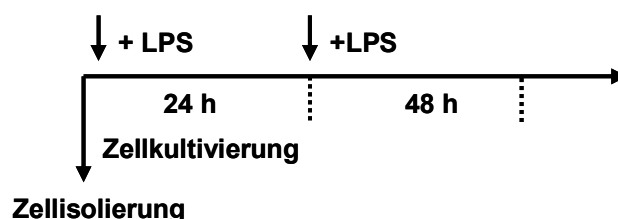
4. Ergebnisse

4.1 Veränderte basale Zytokinexpression in Kupfferzellen unter Entzündungsbedingungen *in vivo* und *in vitro*

Zunächst sollte untersucht werden, ob sich die basale Zytokin- und PGD₂-Expression unter Normalbedingungen und bei experimenteller Entzündung unterscheidet. Die experimentelle Entzündung wurde durch eine längerfristige LPS-Behandlung *in vivo* und *in vitro* simuliert. Die experimentelle Entzündung *in vivo* wurde dabei durch eine intraperitoneale LPS-Injektion in einer Konzentration von 2 mg LPS/kg Körpergewicht („LPS-Ratten“) 12 - 14 h vor der Zellpräparation erreicht:



Im Versuchsaufbau wurden dann jeweils die kultivierten KC der „LPS-Ratten“ mit den KC der unbehandelten Kontrolltiere (Normalbedingung) verglichen. Vorversuche der Arbeitsgruppe hatten ergeben, dass Placebo-behandelte Tiere (Injektion des entsprechenden Volumens 0,1% RSA in 0,9% NaCl) sich nicht von unbehandelten Kontrolltieren unterschieden. Die experimentelle Entzündung *in vitro* wurde durch eine längerfristige – d.h. 24- oder 48-stündige *in-vitro*-LPS-Behandlung (1 ng/ml LPS) der kultivierten KC simuliert (LPS-behandelte KC):



Im Versuchsaufbau wurden dann jeweils diese LPS-behandelten KC mit unbehandelten KC (Normalbedingung) verglichen.

4.1.1 Einfluss einer längerfristigen LPS-Behandlung *in vivo* auf die basale Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6

Um zu untersuchen, ob sich die basale Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β - und IL-6 unter Normalbedingungen und Entzündungsbedingungen *in vivo* unterscheidet, wurde die Zytokinexpression auf mRNA- und Proteinebene in den KC aus Kontroll- und „LPS-Ratten“ bestimmt. Für die KC der Kontrollratte wurde früheren Beobachtungen der eigenen

Arbeitsgruppe [MÄCK et al. 2001a] entsprechend eine schwach ausgeprägte basale TNF α -mRNA- und IL-6-mRNA-Expression sowie eine deutlich ausgeprägte IL-1 β -mRNA-Expression gefunden (Abb. 5). KC aus „LPS-Ratten“ exprimierten sowohl nach 24 h als auch nach 48 h deutlich signifikant weniger TNF α -mRNA als KC aus Kontrolltieren. Ein ähnlicher Trend ließ sich für die IL-1 β -mRNA-Expression beobachten, allerdings war der Effekt – wahrscheinlich aufgrund der relativ stark streuenden Kontrollwerte – nicht signifikant. In Bezug auf die Expression der IL-6-mRNA zeigten sich dagegen weder nach 24 h noch nach 48 h Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den „LPS-Ratten“ (Abb. 5).

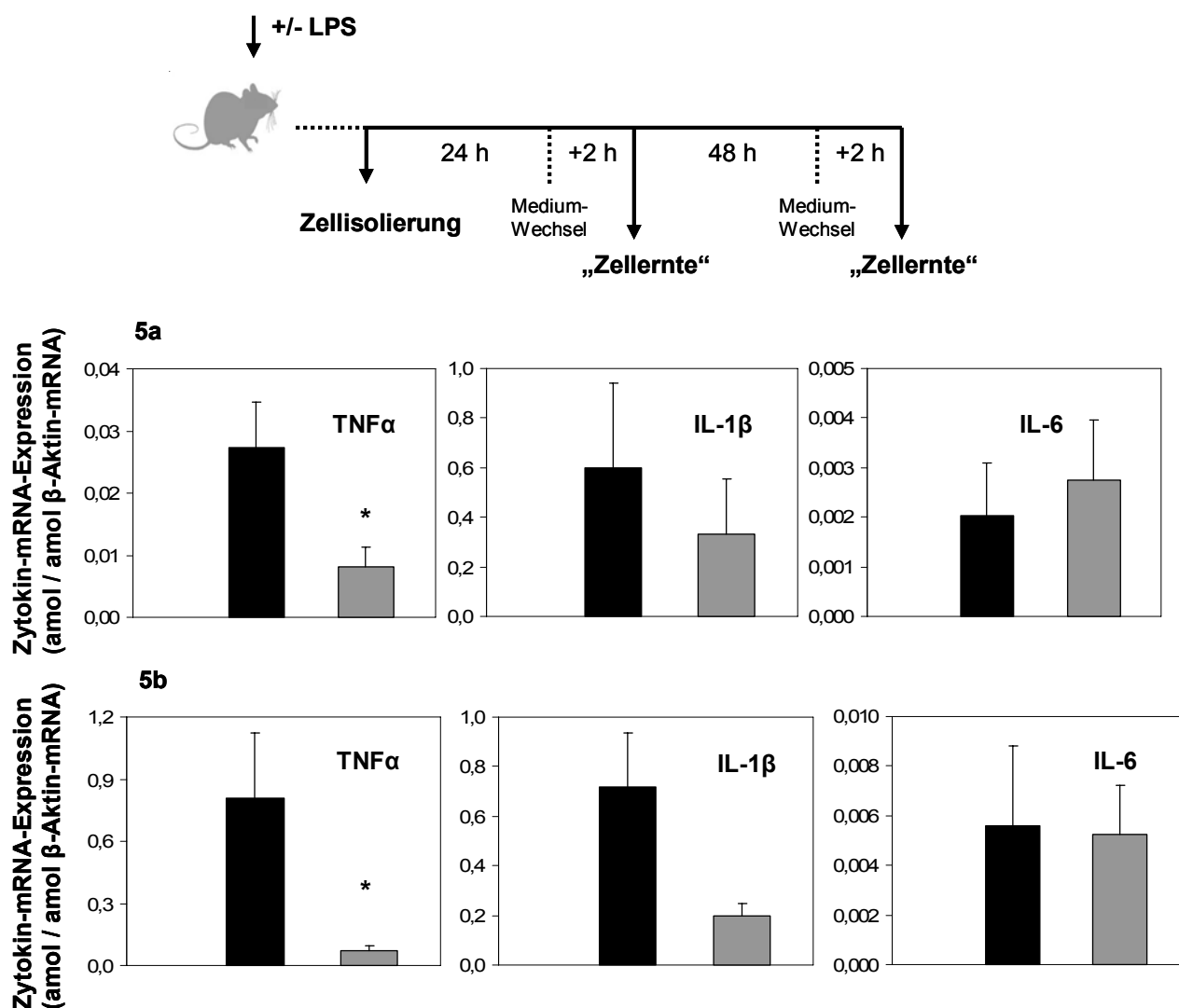


Abb. 5. Basale Expression von TNF α -, IL-1 β - und IL-6-mRNA nach 24 h (5a) und 48 h (5b) – Vergleich von Kontrolltieren mit „LPS-Ratten“. 12 - 14 h vor der Isolierung wurde den „LPS-Ratten“ LPS in einer Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach der Präparation wurden die Zellen beider Versuchsgruppen über 24 h bzw. 48 h kultiviert. Nach 24-stündiger bzw. 48-stündiger Kultivierung wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und die Zellen nach weiteren 2 h in Kultur „geerntet“. Gesamt-RNA wurde isoliert, cDNA synthetisiert und die Zytokin-mRNA-Expression mittels LightCycler-PCR (LC-PCR) im Verhältnis zur β -Aktin-Expression quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus fünf (TNF α), vier (IL-1 β) bzw. sechs (IL-6) Versuchen. Dargestellt sind jeweils die Werte der basalen Zytokin-mRNA-Expression in unbehandelten KC aus Kontrolltieren (schwarz) und aus „LPS-Ratten“ (grau). * $p \leq 0,05$: signifikant schwächere Expression in der „LPS-Ratte“ im Vergleich zur Kontrollratte (Student's t-test für ungepaarte Proben).

Beim Vergleich der 24-h- und 48-h-Werte fiel auf, dass die TNF α -mRNA-Expression sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der „LPS-Rattengruppe“ deutlich anstieg. Ein ähnlicher Anstieg der Expression war weder für die IL-1 β -mRNA- noch für die IL-6-mRNA-Expression beobachtbar (nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob die geringere Expression der TNF α -mRNA in der „LPS-Ratte“ im Vergleich zur Kontrollratte in einer ebenfalls reduzierten Proteinsynthese resultierte, wurden die Proteinkonzentrationen von TNF α und IL-6 im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Zellüberstände, die zur Proteinbestimmung eingesetzt wurden, stammen von denselben Zellen, die auch zur Bestimmung der mRNA-Expression verwendet wurden. Die Synthese des IL-1 β -Proteins erfolgt über das 35-kDa Vorläufer-Protein, welches im Zytosol akkumuliert [SINGER et al. 1988] und durch das IL-1 β -converting enzyme (ICE) bzw. Caspase I proteolytisch zur reifen 17-kDa-Form prozessiert wird [CERETTI et al. 1992]. Die Synthese des 35-kDa IL-1 β -Präcursor-Proteins in LPS-stimulierten KC ohne nachfolgende Prozessierung zum reifen 17-kDa IL-1 β -Protein ist beschrieben [ARMBRUST et al. 1995]. Auch in Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe konnte eine intrazelluläre Akkumulation von IL-1 β -Präcursor-Protein aber keine Prozessierung und Freisetzung des reifen IL-1 β aus kultivierten KC beobachtet werden [MÄCK et al. 2001b]. Die Proteinkonzentration von IL-1 β wurde daher aufgrund des bekannten Phänomens, dass keine Freisetzung von reifen IL-1 β aus kultivierten KC stattfindet, nicht untersucht. Die KC aus „LPS-Ratten“ produzierten nach 24 h signifikant weniger TNF α -Protein als die KC aus Kontrollratten, parallel zur geringeren TNF α -mRNA-Expression der „LPS-Ratten“ zu diesem Zeitpunkt. Für IL-6 zeigte sich entsprechend den Ergebnissen auf der mRNA-Ebene keine unterschiedliche IL-6-Proteinexpression in KC aus „LPS-Ratten“ und aus Kontrollratten (Abb. 6).

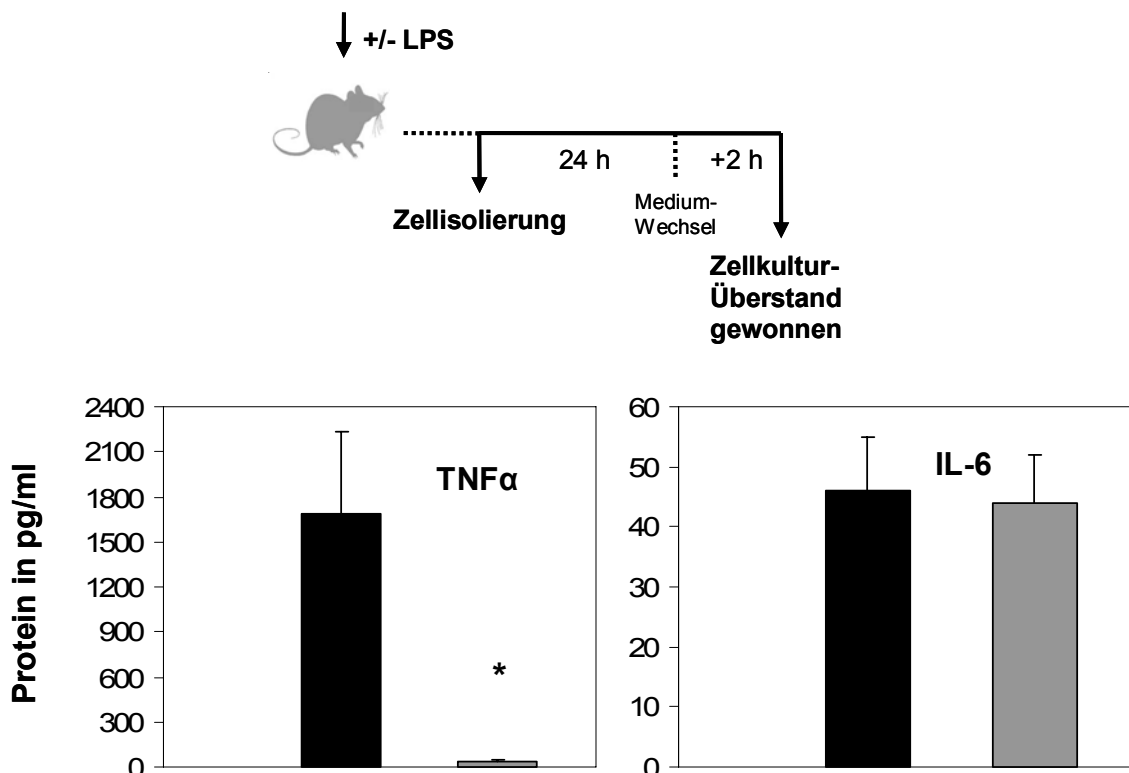


Abb. 6. Basale Expression von TNF α - und IL-6-Protein nach 24 h – Vergleich von Kontrolltieren mit „LPS-Ratten“. 12 - 14 h vor der Isolierung wurde den „LPS-Ratten“ LPS in einer Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach 24-stündiger Kultivierung wurden die Überstände parallel zum Abkratzen der Zellen 2 h nach dem Mediumwechsel abgenommen. Im Zellkulturmedium wurde die Proteinmenge mittels ELISA bestimmt. In der „LPS-Rattengruppe“ lag die TNF α -Freisetzung zum Teil unterhalb des Messbereichs des ELISA und wurde dann in der Statistik gleich null gesetzt. Es ist jeweils die Proteinfreisetzung der KC der Kontrollratten (schwarz) der Proteinfreisetzung der „LPS-Ratten“ (grau) gegenübergestellt. Die Werte sind Mittelwerte aus vier (Kontrollratte) bzw. fünf („LPS-Ratten“) Versuchen. * $p \leq 0,05$: signifikant geringere TNF α -Proteinfreisetzung in der „LPS-Ratte“ als in der Kontrollratte (Student's t-Test für ungepaarte Proben).

4.1.2 Einfluss einer längerfristigen LPS-Behandlung *in vitro* auf die basale Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6

Nachdem die KC der „LPS-Ratte“ TNF α signifikant schwächer exprimierten als die KC der Kontrollratte, sollte untersucht werden, ob auch eine *in vitro* simulierte Entzündung die basale Zytokinexpression beeinflusst. Wie unter Punkt 4.1 beschrieben, wurde die Entzündung über eine längerfristige *in-vitro*-LPS-Behandlung der kultivierten KC erreicht. Die KC wurden einige Stunden nach der Präparation entweder ohne oder mit LPS in einer Konzentration von 1 ng/ml über 24 h bzw. 48 h behandelt (LPS-behandelte KC) und dann „geerntet“. Unter pathologischen Bedingungen wie im Rahmen einer Sepsis können im Blutstrom LPS-Spiegel von oft mehr als 400 pg/ml gemessen werden [OPAL et al. 1999], so dass die gewählte LPS-Konzentration von 1 ng/ml pathophysiologisch relevante Spiegel repräsentierte. Frühere Versuche hatten gezeigt, dass LPS bereits in einer Konzentration von 1 ng/ml Serum-unabhängig (d.h. ohne LBP (vgl. Einleitung 1.3.2.1)) die Expression von Zytokin-mRNA und -Protein steigert [MÄCK et al. 2001a].

Nach 24 h zeigten die LPS-behandelten KC der Kontrollratte eine signifikant geringere TNF α - und eine tendenziell geringere IL-1 β -mRNA-Expression als die unbehandelten KC der Kontrollratte. Die Expression der IL-6-mRNA war in den über 24 h mit LPS behandelten und unbehandelten Zellen nicht unterschiedlich (Abb. 7a). Nach 48 h lag sowohl die TNF α - als auch die IL-1 β -mRNA-Expression in den über 48 h mit LPS behandelten KC der Kontrollratte signifikant unter der Expression der unbehandelten KC während die Expression der IL-6-mRNA nicht signifikant unterschiedlich war (Abb. 7b).

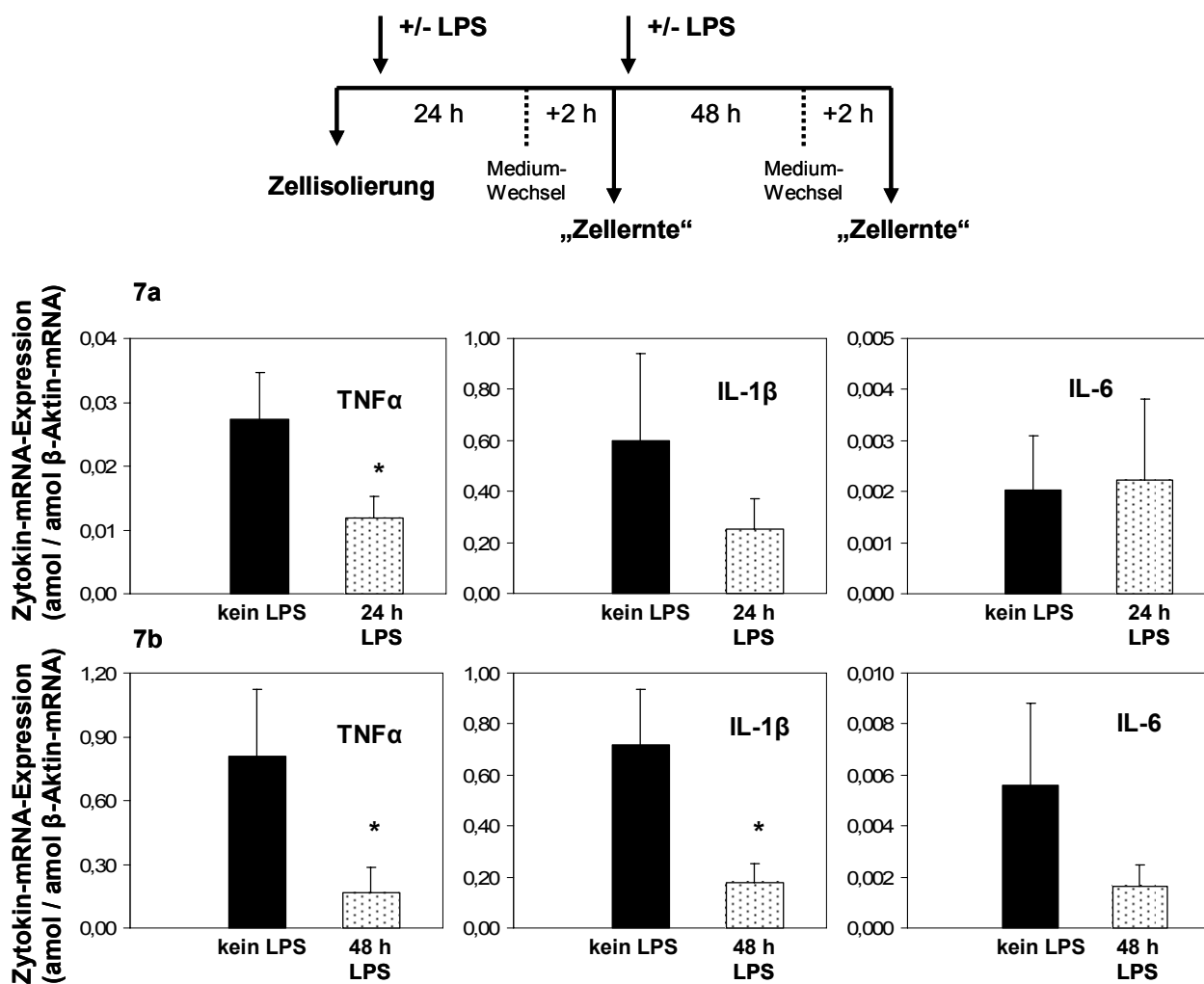


Abb. 7. Basale Expression von TNF α -, IL-1 β - und IL-6-mRNA nach 24-stündiger (7a) und 48-stündiger (7b) LPS-Behandlung in Kontrollratten. Nach 24-stündiger bzw. 48-stündiger Kultivierung mit oder ohne LPS (1 ng/ml) wurden die Zellen 2 h nach einem Mediumwechsel „geerntet“ und die mRNA mittels LC-PCR im Verhältnis zur β -Aktin-Expression quantifiziert. Die Abbildung zeigt die basale Zytokin-mRNA-Expression der unbehandelten Kontrollen (kein LPS) und die Expression der über 24 h und 48 h mit LPS (1 ng/ml) behandelten Zellen (24 h LPS bzw. 48 h LPS). Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus fünf (TNF α + IL-6) bzw. vier (IL-1 β) Versuchen. * $p \leq 0,05$: signifikant unterschiedliche Expression gegenüber unbehandelten KC (Student's t-Test für gepaarte Proben).

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hatten auch eine Steigerung der TNF α - und IL-6-Proteinfreisetzung durch LPS in einer Konzentration von 1 ng/ml gezeigt. Um die Zytokinfreisetzung auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurde nach 24-stündiger Kultivierung ein Mediumwechsel vorgenommen und nach 2 h das von den KC produzierte Protein mittels ELISA bestimmt. Die LPS-behandelten KC der Kontrollratte zeigten, parallel zur signifikant geringeren Expression von TNF α auf mRNA-Ebene (vgl. Abb. 7a), eine signifikant geringere TNF α -Proteinfreisetzung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abb. 8). Im Gegensatz dazu fiel die IL-6-Proteinfreisetzung in den über 24 h mit LPS behandelten KC signifikant höher aus als in den unbehandelten KC (Abb. 8). Auf mRNA-Ebene konnte dieser Effekt weder nach 24-stündiger noch nach 48-stündiger LPS-Behandlung gezeigt werden.

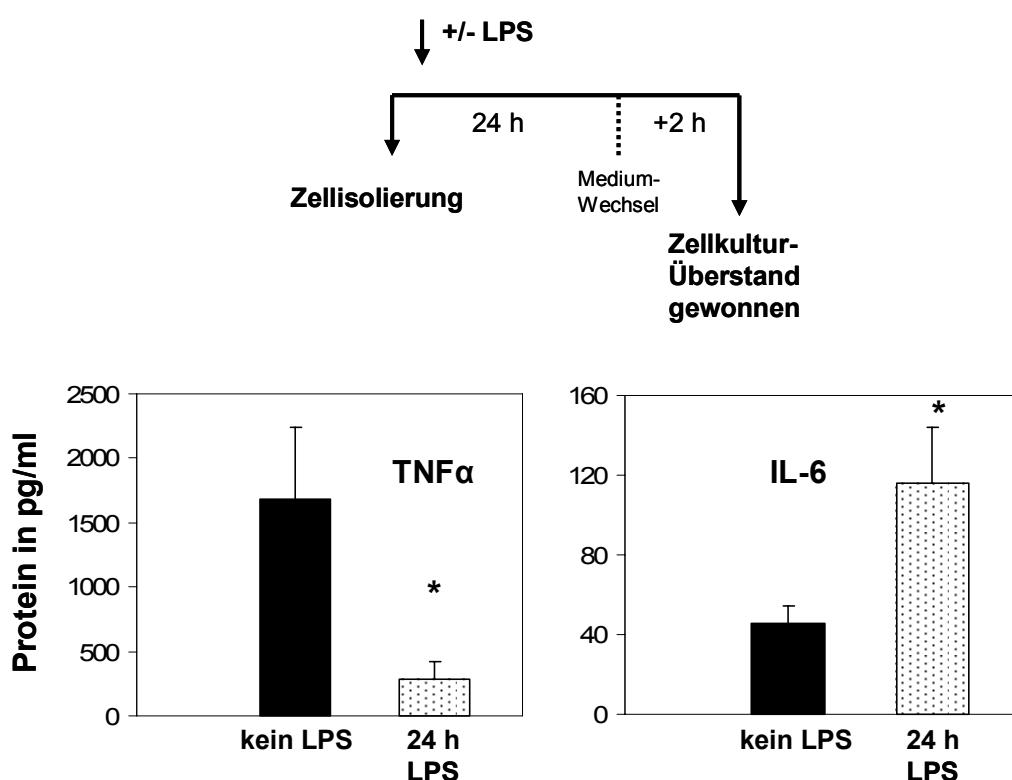


Abb. 8. Basale Expression von TNF α - und IL-6-Protein nach 24-stündiger LPS-Behandlung in Kontrollratten. Nach 24stündiger Kultivierung mit oder ohne LPS (1 ng/ml) wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Nach weiteren 2 h wurden die Kulturüberstände parallel zum Abkratzen der Zellen abgenommen. Im Zellkulturmedium wurde die Proteinmenge mittels ELISA bestimmt. Es sind jeweils die TNF α - und IL-6-Proteinmengen der unbehandelten Kontrollen (kein LPS) und der mit LPS (1 ng/ml) über 24 h behandelten Zellen (24 h LPS) dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchen. * $p \leq 0,05$: signifikant unterschiedliche Expression gegenüber unbehandelten KC (Student's t -Test für ungepaarte Proben).

Die basale TNF α -Expression in den „LPS-Ratten“ war deutlich schwächer als in den Kontrollratten (vgl. 4.1.1). Im Folgenden wurden auch die aus der „LPS-Ratte“ isolierten KC zusätzlich *in vitro* mit LPS behandelt (LPS-behandelte KC). Nach 24 h zeigten die LPS-behandelten KC aus „LPS-Ratten“ eine tendenziell geringere Expression der IL-1 β -mRNA als die nicht behandelten Zellen. Die Expression der TNF α - und IL-6-mRNA der LPS-behandelten und der nicht behandelten Zel-

len aus „LPS-Ratten“ war nach 24 h nicht unterschiedlich (Abb. 9a). Nach 48 h lag sowohl die TNF α - und IL-1 β - als auch die IL-6-mRNA-Expression in den über 48 h mit LPS behandelten KC der „LPS-Ratte“ signifikant unter der Expression der nicht behandelten KC der „LPS-Ratte“ (Abb. 9b). Die *in vitro* simulierte Entzündung beeinflusste die basale TNF α - und IL1 β -mRNA-Expression nach 48 h in KC aus Kontroll- (vgl. Abb. 7b) und aus „LPS-Ratten“ damit parallel.

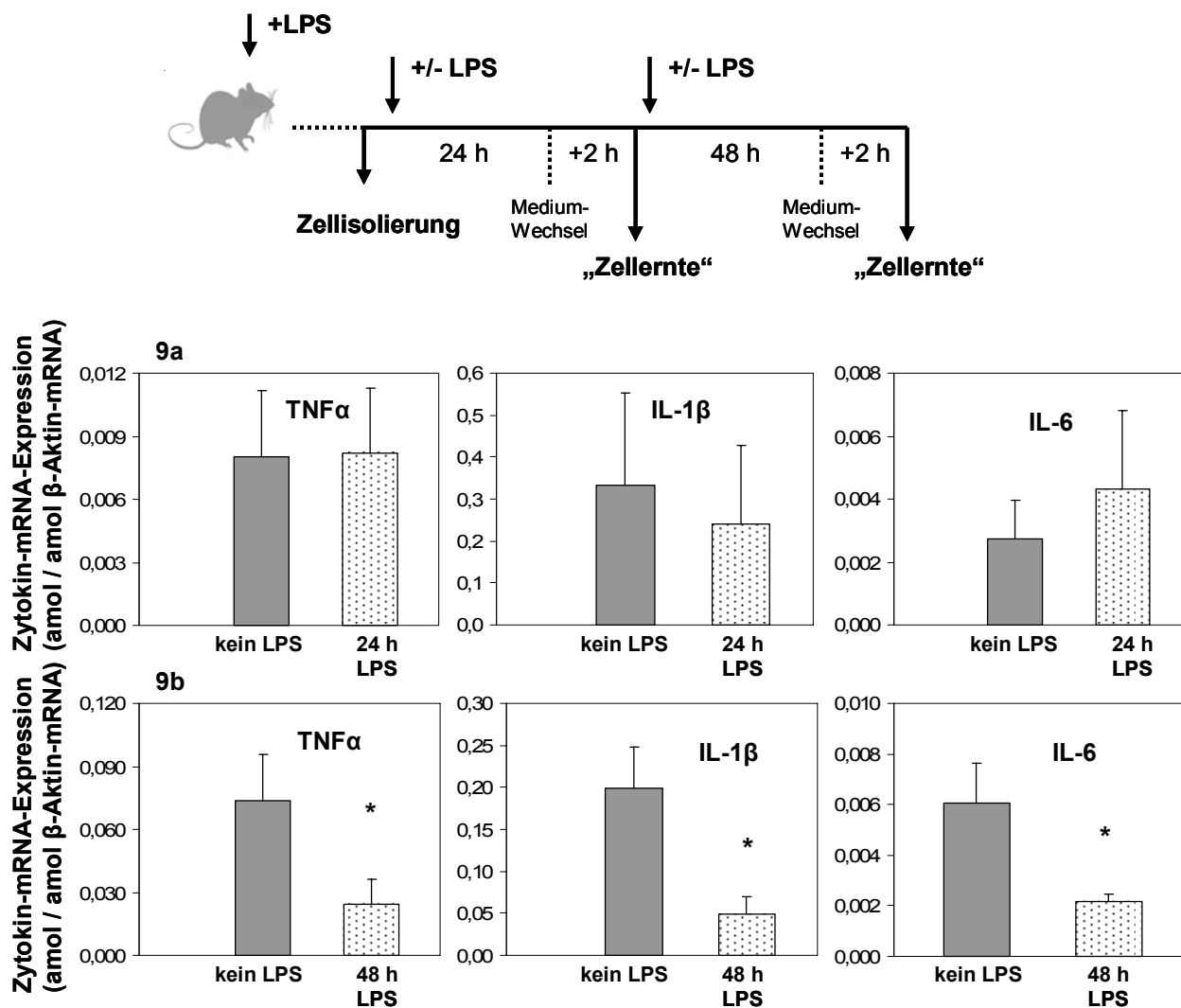


Abb. 9. Basale Expression von TNF α -, IL-1 β - und IL-6-mRNA nach 24-stündiger (9a) und 48-stündiger (9b) LPS-Behandlung in „LPS-Ratten“. 12 - 14 h vor der Isolierung wurde den Ratten LPS in einer Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert („LPS-Ratten“). Die weitere Durchführung erfolgte wie in Abb. 7 angegeben. Dargestellt ist die Zytokin-mRNA-Expression der unbehandelten Kontrollen (kein LPS) und die Expression der über 24 h und 48 h mit LPS (1 ng/ml) behandelten Zellen (24 h LPS bzw. 48 h LPS) der „LPS-Ratte“. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus fünf (TNF α), vier (IL-1 β) und sechs (IL-6) Versuchen. * $p \leq 0,05$: signifikant unterschiedliche Expression gegenüber unbehandelten KC der „LPS-Ratte“ (Student 's t-Test für gepaarte Proben).

Die Zytokinfreisetzung wurde auch auf Proteinebene untersucht. In den „LPS-Ratten“ zeigte sich nach 24 h in Übereinstimmung mit den mRNA-Daten (vgl. Abb. 9a) weder für TNF α noch für IL-6 eine signifikant unterschiedliche Proteinfreisetzung zwischen den LPS-behandelten und den nicht behandelten KC aus „LPS-Ratten“ (Abb.10).

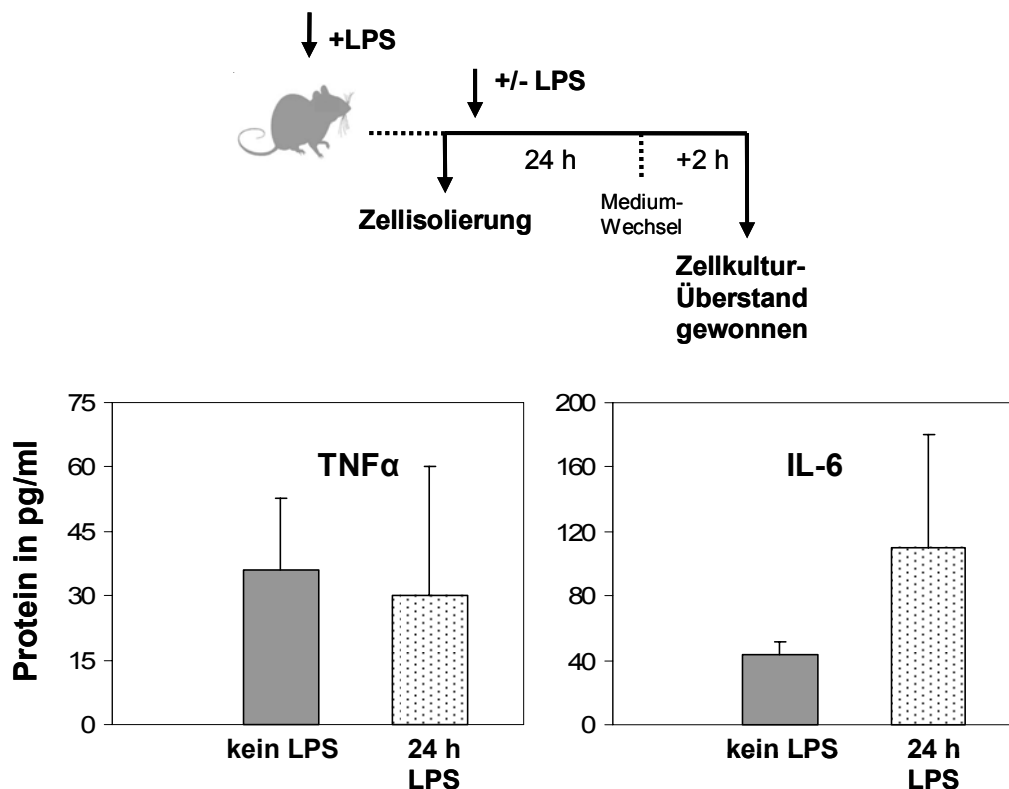


Abb. 10. Basale Expression von TNF α - und IL-6-Protein nach 24-stündiger LPS-Behandlung in „LPS-Ratten“. 12 - 14 h vor der Isolierung wurde den Ratten LPS in einer Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert („LPS-Ratten“). Die weitere Durchführung erfolgte wie in Abb. 8 angegeben. Es sind jeweils die TNF α - und IL-6-Proteinmengen der Kontrollen (kein LPS) und der mit LPS (1 ng/ml) über 24 h behandelten Zellen (24 h LPS) dargestellt. Für TNF α ergaben sich zum Teil sowohl für die unbehandelten als auch für die LPS-behandelten KC Proteinmengen unterhalb des Messbereichs des ELISA, sie wurden in der Statistik gleich null gesetzt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus fünf (TNF α) bzw. vier (IL-6) Versuchen.

Durch den enzymatischen Isolierungsprozess werden auch für die Signalvermittlung notwendige Oberflächen-Rezeptoren verdaut, die erst nach 24 h bis 48 h reexprimiert werden. Der Effekt der *in vitro* generierten Entzündung sollte daher auch an länger d.h. 48 h bzw. 72 h kultivierten KC der Kontrollratte untersucht werden. Die Versuche mit länger kultivierten KC ergaben, dass jetzt schon KC, die über 24 h mit LPS behandelt wurden, nicht nur eine signifikant geringere TNF α sondern auch – evtl. aufgrund der Reexpression notwendiger Rezeptoren der Signalvermittlung während der längeren Kultivierungszeit - eine signifikant geringere IL-1 β -mRNA-Expression zeigten, als die unbehandelten KC (nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit den vorausgegangenen Versuchen (vgl. Abb. 7b), exprimierten die über 48 h mit LPS behandelten KC die TNF α - und IL-1 β -mRNA – nicht aber die IL-6-mRNA - signifikant geringer als die unbehandelten KC der Kontrollratte (nicht gezeigt).

4.1.3 Einfluss einer längerfristigen LPS-Behandlung *in vivo* auf die basale Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10

Die basale Expression des proinflammatorischen TNF α war in den „LPS-Ratten“ deutlich schwächer als in den Kontrollratten (vgl. 4.1.1). Da an der geringeren Expression der proinflammatorischen Zytokine antiinflammatorische Faktoren wie IL-10 beteiligt sein könnten, wurde auch die basale Expression von IL-10 unter Normal- und Entzündungsbedingungen verglichen. Es wurden dieselben Proben untersucht, die auch für die Bestimmung der proinflammatorischen Zytokine verwendet wurden. Die Versuche hatten ergeben, dass die KC der „LPS-Ratten“ eine signifikant geringere Expression der TNF α - und eine tendenziell geringere Expression der IL-1 β -mRNA zeigten als die KC der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 5). Im Gegensatz zur signifikant geringeren basalen Expression der proinflammatorischen TNF α -mRNA in der „LPS-Ratte“ war die basale mRNA-Expression des antiinflammatorischen IL-10 sowohl nach 24 h als auch nach 48 h nicht signifikant unterschiedlich in den aus Kontroll- und aus „LPS-Ratten“ isolierten KC (Abb. 11).

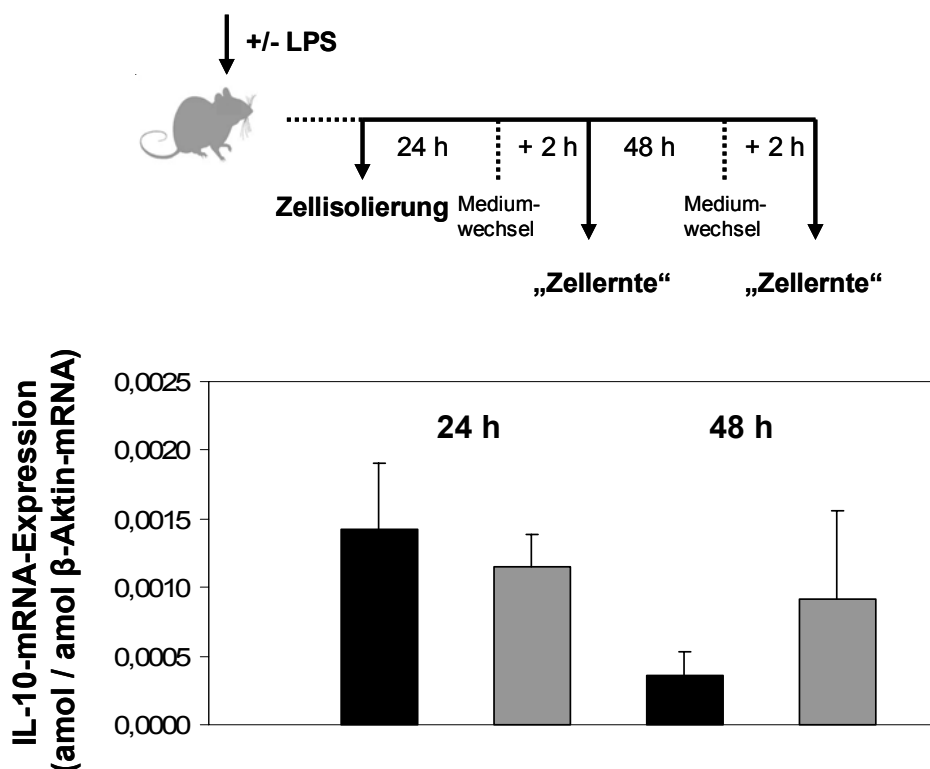


Abb. 11. Basale IL-10-mRNA-Expression nach 24 h und 48 h – Vergleich von Kontrolltieren mit „LPS-Ratten“. Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 5 angegeben. Dargestellt ist die IL-10-mRNA-Expression für die Kontrolltiere (schwarz) und die „LPS-Ratten“ (grau). Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchen.

Die Proteinbestimmung mittels ELISA hatte ergeben, dass die KC der „LPS-Ratten“ nach 24 h signifikant weniger TNF α -Protein als die KC der Kontrollratten produzierten. Das von den KC der „LPS-Ratte“ und der Kontrollratte produzierte IL-6-Protein war nicht signifikant unterschiedlich (vgl. Abb. 6). Die basale Produktion des IL-10-Proteins in den KC der „LPS-Ratte“ und der

Kontrollratte nach 24 h war ebenfalls den Ergebnissen auf mRNA-Ebene entsprechend (vgl. Abb. 11) nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 12).

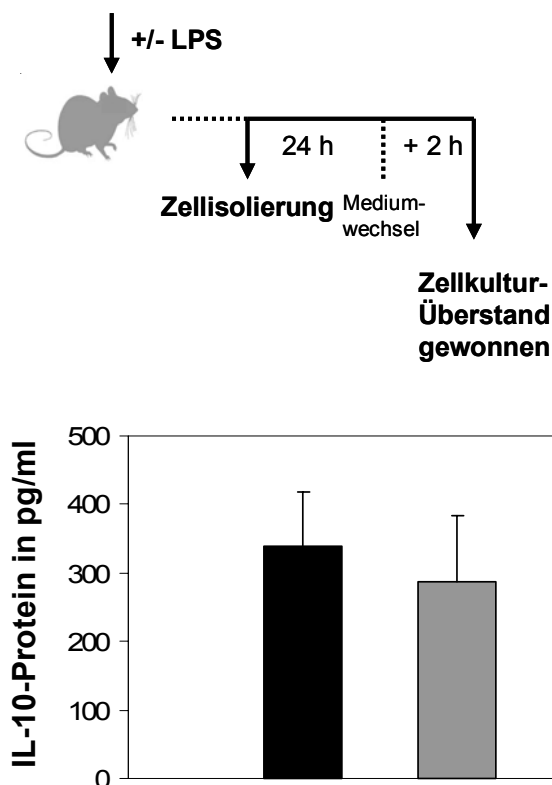


Abb. 12. Basale IL-10-Proteinexpression nach 24 h – Vergleich von Kontrolltieren mit „LPS-Ratten“. Die Durchführung erfolgte wie in Abbildung 6 angegeben. Es ist jeweils die Proteinfreisetzung der KC der Kontrollratten (schwarz) der Proteinfreisetzung der „LPS-Ratten“ (grau) gegenübergestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei Versuchen.

Um zu untersuchen, ob die *in-vivo*-LPS-Behandlung die Proteinproduktion der frisch kultivierten KC beeinflusst, wurde mittels ELISA auch diejenige Proteinmenge bestimmt, die von den KC während der ersten 24 h nach der Präparation produziert wurde. Dazu wurden die Zellkulturüberstände am Tag nach der Präparation nach 24 h vor dem Mediumwechsel abgenommen und gesammelt. Innerhalb dieses Zeitraums produzierten die KC aus „LPS-Ratten“ basal signifikant weniger TNF α - und IL-6-Protein und signifikant mehr IL-10-Protein als die KC aus Kontrollratten: Im Gegensatz zur signifikant geringeren basalen Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine wurde von den KC aus „LPS-Ratten“ basal signifikant mehr antiinflammatorisches IL-10 als von den KC aus Kontrollratten freigesetzt (Abb. 13).

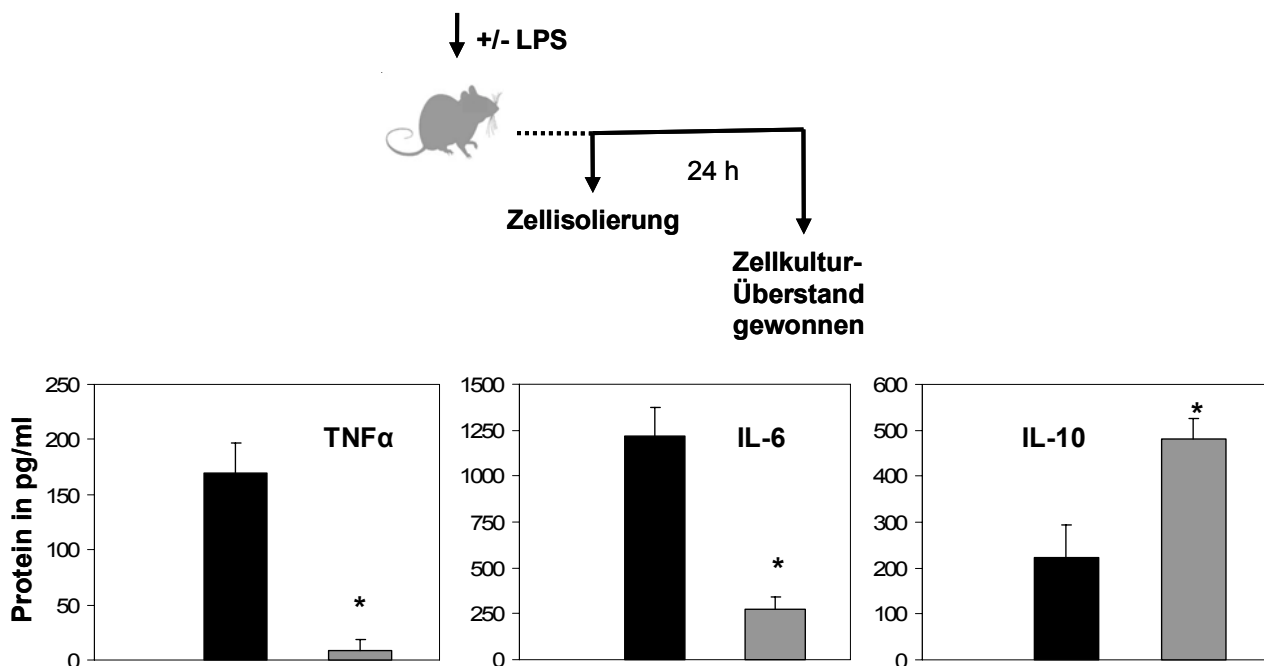


Abb. 13. Basale Expression von TNF α -, IL-6- und IL-10-Protein in 24-h-Überständen – Vergleich von Kontrolltieren mit „LPS-Ratten“. 12 - 14 h vor der Isolierung wurde den „LPS-Ratten“ LPS in einer Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach der Präparation wurden die Zellen beider Versuchsgruppen kultiviert. 24 h nach der Präparation wurden die Kulturüberstände gesammelt innerhalb der beiden Versuchsgruppen abgenommen und die Proteinmenge mittels ELISA bestimmt. Es ist das freigesetzte Protein der KC aus Kontrollratten (schwarz) dem freigesetzten Protein der KC aus „LPS-Ratten“ (grau) gegenübergestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei Versuchen. * $p \leq 0,05$: signifikant unterschiedliche Proteinfreisetzung in den KC aus „LPS-Ratten“ und Kontrollratten (Student's t-Test für ungepaarte Proben).

4.1.4 Einfluss einer längerfristigen LPS-Behandlung *in vitro* auf die basale Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10

Die *in vitro* simulierte Entzündung beeinflusste die basale Zytokinexpression von TNF α und IL-1 β in der Kontrollratte: nach 24 h exprimierten die LPS-behandelten KC TNF α auf mRNA- und auf Protein-Ebene - nicht jedoch IL-6 - signifikant schwächer als die unbehandelten KC (vgl. Abb. 7; Abb. 8). Auch die IL-1 β -mRNA wurde nach 24 h tendenziell und nach 48 h signifikant weniger in den LPS-behandelten KC exprimiert (vgl. Abb. 7). Im Gegensatz zur geringeren Expression der proinflammatorischen Zytokine zeigten die über 24 h mit LPS behandelten KC der Kontrollratte eine tendenziell höhere IL-10-mRNA-Expression als die unbehandelten KC. Nach 48 h war die IL-10-mRNA-Expression der LPS-behandelten und unbehandelten Zellen nicht unterschiedlich (Abb. 14a). Auch die IL-10-Proteinfreisetzung der mit LPS behandelten und unbehandelten KC der Kontrollratte war nach 24 h nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 14b).

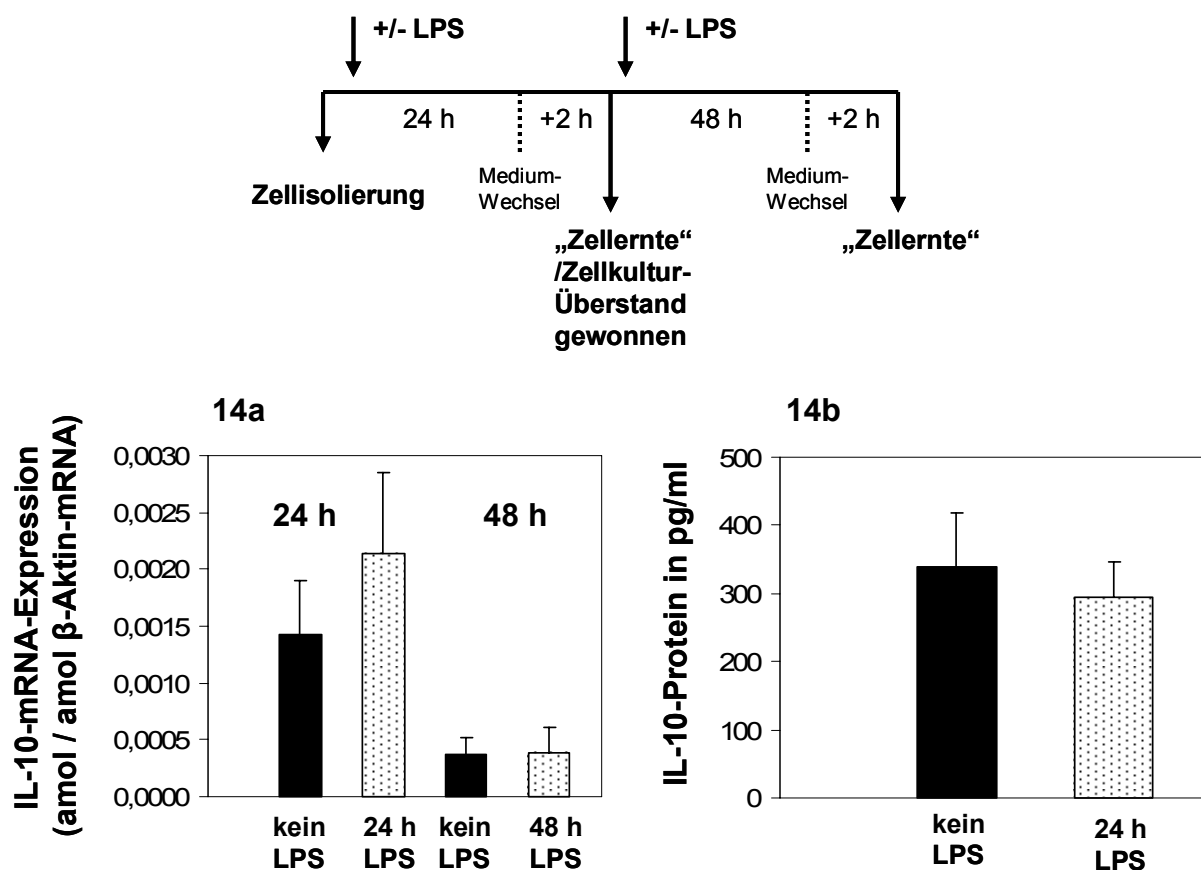


Abb. 14. Basale Expression von IL-10-mRNA (14a) und IL-10-Protein (14 b) nach 24-stündiger sowie basale IL-10-mRNA-Expression nach 48-stündiger LPS-Behandlung in Kontrollratten. Nach 24-stündiger Kultivierung mit oder ohne LPS (1 ng/ml) wurden die Zellen 2 h nach einem Mediumwechsel „geerntet“ und die Zellkulturüberstände abgenommen. Nach 48-stündiger Kultivierung mit oder ohne LPS (1 ng/ml) wurden die Zellen ebenfalls 2 h nach einem Mediumwechsel „geerntet“. Die mRNA wurde mittels LC-PCR im Verhältnis zur β -Aktin-Expression quantifiziert, die Proteinmenge wurde mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist die Zytokin-mRNA-Expression bzw. die Proteinfreisetzung der unbehandelten Kontrollen (kein LPS) und die Expression der über 24 h bzw. 48 h mit LPS (1 ng/ml) behandelten Zellen (24 h LPS bzw. 48 h LPS) der Kontrollratte. 14a: Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchen. 14 b: Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei Versuchen.

Die aus der „LPS-Ratte“ isolierten und zusätzlich *in vitro* mit LPS behandelten KC zeigten nach 24 h eine tendenziell geringere IL-1 β -mRNA- und nach 48 h eine signifikant geringere IL-1 β -, TNF α - und IL-6-mRNA-Expression als die nicht behandelten KC (vgl. Abb. 9). Für IL-10 ergab sich nach 24 h eine signifikant geringere mRNA-Expression in den zusätzlich *in vitro* mit LPS behandelten KC als in den nicht behandelten KC aus „LPS-Ratten“ (Abb. 15a). Nach 48 h zeigten sich keine Unterschiede zwischen den LPS-behandelten und unbehandelten KC aus „LPS-Ratten“ (Abb. 15a). Die zusätzlich *in vitro* mit LPS behandelten KC setzten parallel zu den mRNA-Ergebnissen nach 24 h signifikant weniger IL-10-Protein als die nicht behandelten KC aus „LPS-Ratten“ frei (Abb. 15b).

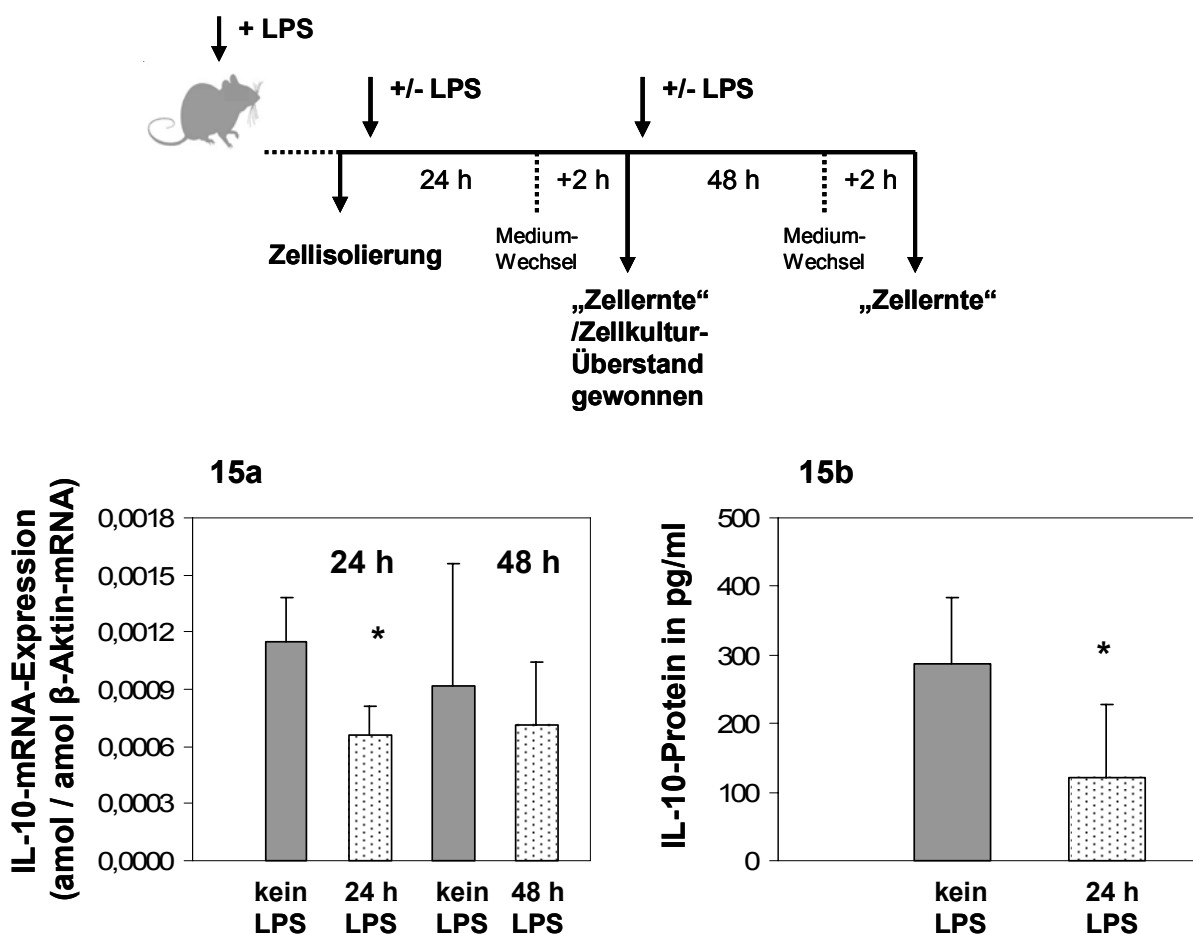


Abb. 15. Basale Expression von IL-10-mRNA (15 a) und IL-10-Protein (15 b) nach 24-stündiger sowie basale IL-10-mRNA-Expression nach 48-stündiger LPS-Behandlung in „LPS-Ratten“. 12 - 14 h vor der Isolierung wurde den „LPS-Ratten“ LPS in einer Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die weitere Durchführung erfolgte wie in Abb. 14 angegeben. Dargestellt ist die Zytokin-mRNA-Expression bzw. die Proteinfreisetzung der unbehandelten Kontrollen (kein LPS) und die Expression der über 24 h bzw. 48 h mit LPS (1 ng/ml) behandelten Zellen (24 h LPS bzw. 48 h LPS) aus „LPS-Ratten“. 15a: Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier (24 h) und fünf (48 h) Versuchen. 15 b: Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei Versuchen. * $p \leq 0,05$: signifikant unterschiedliche Expression gegenüber unbehandelten KC aus „LPS-Ratten“ (Student´s t-Test für gepaarte Proben).

4.1.5 Einfluss einer längerfristigen LPS-Behandlung *in vivo* und *in vitro* auf die basale Expression von Prostaglandin D_2

Da neben dem Verhältnis von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen auch pro- und antiinflammatorische Prostanoiden für die Ausbildung eines „Entzündungszustandes“ verantwortlich sind, wurde in den Zellkulturüberständen auch das produzierte PGD $_2$ mittels RIA bestimmt. Die aus „LPS-Ratten“ und aus Kontrollratten isolierten KC zeigten eine nicht signifikant unterschiedliche basale PGD $_2$ -Produktion (nicht gezeigt). Die PGD $_2$ -Produktion wurde auch unter den *in vitro* über eine längerfristige LPS-Behandlung simulierten Entzündungsbedingungen untersucht. Sowohl nach 24 h als auch nach 48 h war die PGD $_2$ -Produktion der LPS-behandelten und der unbehandelten KC der Kontrollratte ähnlich (nicht gezeigt). Auch für die KC aus „LPS-Ratten“ ergab sich eine ähnliche PGD $_2$ -Produktion in den zusätzlich *in vitro* mit LPS behandelten

und nicht behandelten KC (nicht gezeigt). Beim Vergleich der PGD_2 -Produktion der KC aus Kontrollratten mit der Produktion der KC aus „LPS-Ratten“ unter der *in vitro* generierten Entzündung fiel auf, dass die „LPS-Ratte“ signifikant weniger PGD_2 produzierte (Abb. 16). In weiteren Versuchen müsste geklärt werden, wie sich das antiinflammatorische PGE_2 unter den gewählten Entzündungsbedingungen verhält.

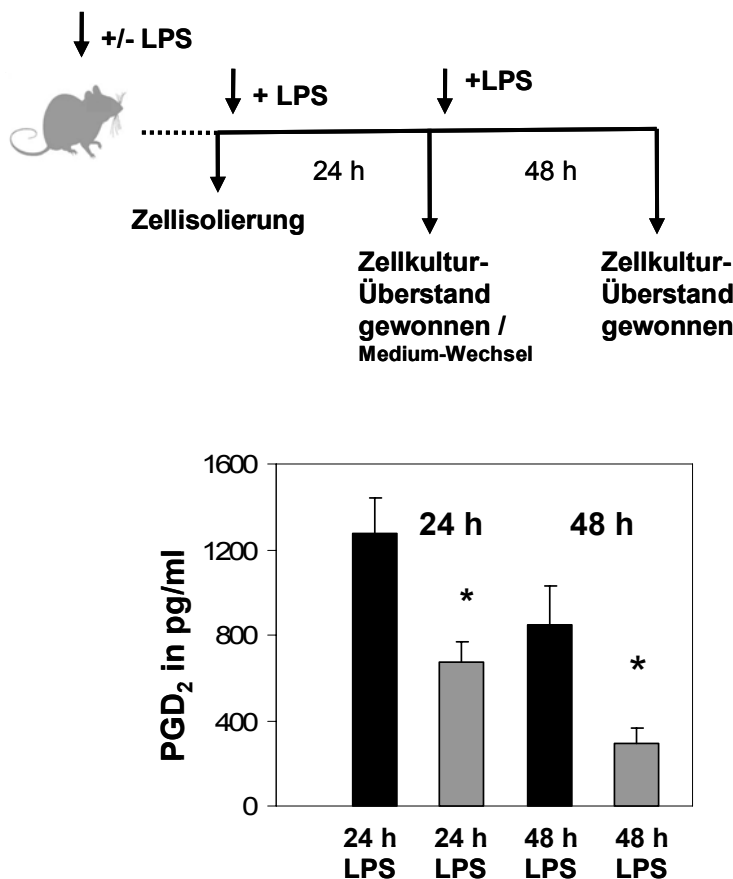
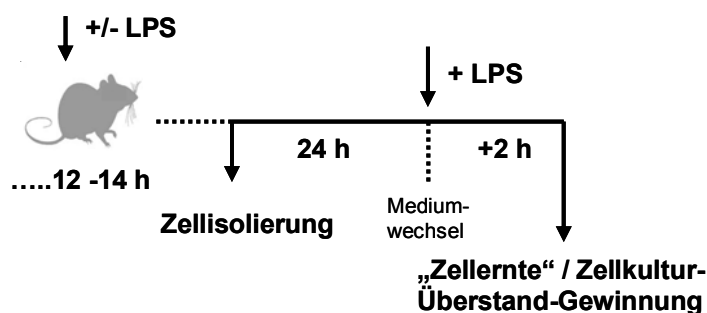


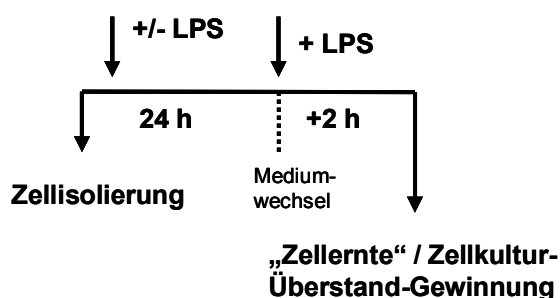
Abb. 16. Basale Expression von ProstaglandinD₂ nach 24-stündiger und 48-stündiger LPS-Behandlung – Vergleich von Kontrolltieren mit „LPS-Ratten“. 12 - 14 h vor der Isolierung wurde den „LPS-Ratten“ LPS in einer Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Sowohl nach 24-stündiger als auch nach 48-stündiger Kultivierung mit LPS in einer Konzentration von 1 ng/ml wurden die Überstände gesammelt innerhalb der beiden Versuchsgruppen abgenommen. Das PGD_2 wurde mittels RIA bestimmt. Das PGD_2 in den Zellkulturüberständen der über 24 h bzw. 48 h LPS-behandelten KC der Kontrollratte (schwarz) und der „LPS-Ratte“ (grau) wird gegenübergestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei (Kontrollratte) und vier (LPS-Ratte) Versuchen. * $p \leq 0,05$: signifikant geringere PGD_2 -Produktion in KC aus „LPS-Ratten“ als in KC aus Kontrollratten (Student's t-test für ungepaarte Proben).

4.2 Veränderte Reaktivität von Kupfferzellen auf kurzfristige LPS-Stimulation unter Entzündungsbedingungen *in vivo* und *in vitro*

Für Monozyten und Makrophagen, die repetitiv mit LPS behandelt wurden, ist eine „Deaktivierung“ oder „Endotoxintoleranz“ beschrieben [CAVAILLON 1995]. Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, welchen Einfluss die im ersten Teil (vgl. 4.1) *in vivo* und *in vitro* durch die längerfristige LPS-Vorbehandlung generierte Entzündung auf die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Zytokinexpression hat und ob unter den gewählten Bedingungen das Phänomen einer „Endotoxintoleranz“ in den KC nachweisbar ist. Zunächst sollte dies unter den *in vivo* generierten Entzündungsbedingungen untersucht werden. Dazu sollte eine kurzfristige LPS-(Re)Stimulation der aus Kontroll- und „LPS-Ratten“ isolierten KC nach folgendem Schema erfolgen und die LPS-induzierte Zytokinexpression verglichen werden:



Anschließend sollte eine möglicherweise veränderte Reaktivität der KC auch unter der *in vitro* generierten Entzündung untersucht werden. Die längerfristig *in vitro* mit LPS behandelten KC (LPS-vorbehandelte KC) sollten nach folgendem Schema kurzfristig mit LPS restimuliert und die LPS-induzierte Zytokinexpression in LPS-vorbehandelten und nicht LPS-vorbehandelten KC (unbehandelte KC) verglichen werden:



4.2.1 Einfluss einer längerfristigen LPS-Vorbehandlung *in vivo* auf die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Expression von TNF α , IL-1 β und IL-6

Um zu untersuchen, ob die *in-vivo*-LPS-Vorbehandlung der „LPS-Ratte“ die LPS-induzierte Zytokinexpression bei kurzfristiger LPS-Restimulation beeinflusst, wurden die 24 h alten Zellen aus Kontrollratte und „LPS-Ratte“ nach dem Mediumwechsel für weitere 2 h mit oder ohne LPS in einer pathophysiologisch relevanten Konzentration von 1 ng/ml inkubiert. Der kurzfristige LPS-Reiz

induzierte in den KC aus „LPS-Ratten“ sowohl die TNF α - als auch die IL-6-mRNA-Expression signifikant schwächer als in den KC aus Kontrollratten. Der LPS-induzierte Anstieg der IL-6-mRNA Expression in den Kontrollratten lag durchschnittlich 10fach über dem LPS-induzierten Anstieg in den „LPS-Ratten“. Die LPS-induzierte IL-1 β -mRNA-Expression war zwischen den KC aus „LPS-Ratten“ und den KC aus Kontrollratten nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 17).

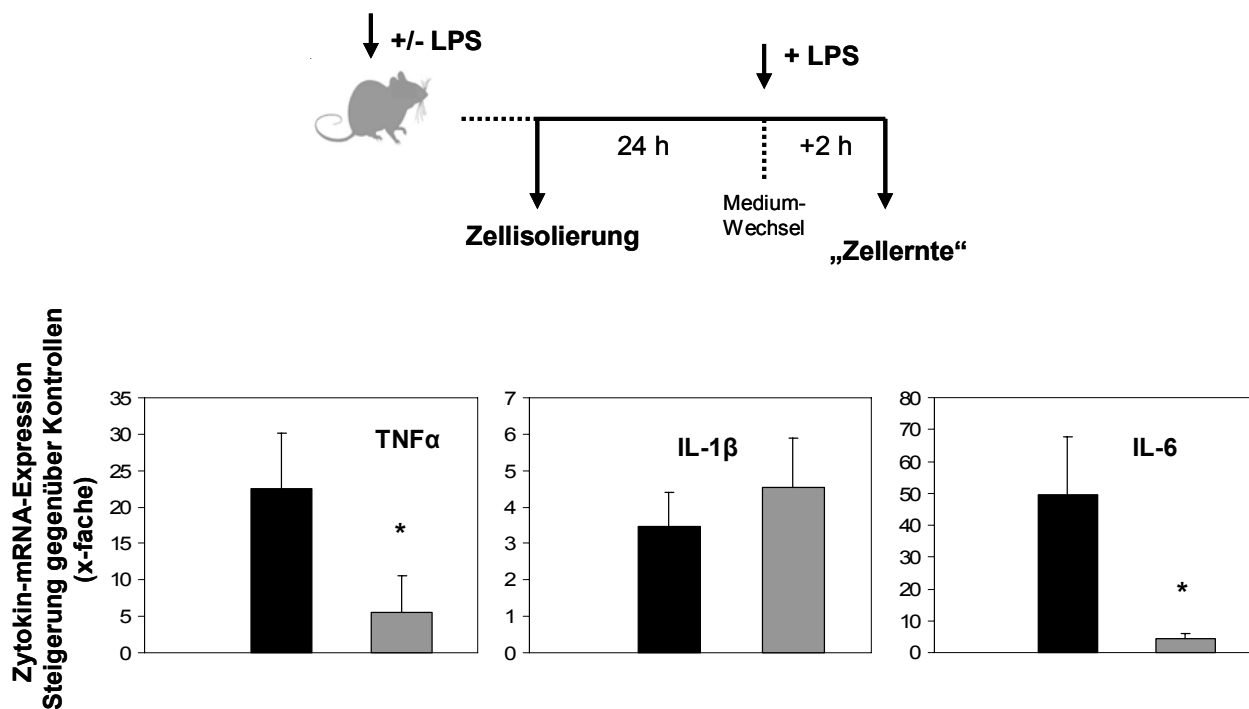


Abb. 17. Stimulierbarkeit der TNF α -, IL-1 β - und IL-6-mRNA-Expression durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus Kontrollratten und „LPS-Ratten“. 12 - 14 h vor der Isolierung wurde den „LPS-Ratten“ LPS in einer Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach 24-stündiger Kultivierung wurden die KC beider Gruppen mit LPS (1 ng/ml) über 2 h stimuliert. Die Zytokin-mRNA wurde mittels LC-PCR im Verhältnis zur β -Aktin-mRNA-Expression quantifiziert. Die LPS-induzierten Effekte auf die Expression der Zytokin-mRNA wurden als x-fache Steigerungen in Bezug auf die unstimuliert belassenen Kontrollen berechnet. Die LPS-induzierte Expression der Zytokin-mRNA in den Kontrollratten (schwarz) ist der LPS-induzierten Expression in den „LPS-Ratten“ (grau) gegenübergestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchen. * $p \leq 0,05$: signifikant unterschiedliche LPS-induzierte Expression in den KC aus Kontrollratten gegenüber KC aus „LPS-Ratten“ (Student's t-Test für ungepaarte Proben).

Parallel zur mRNA-Expression wurde die durch den kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Zytokinexpression auf Proteinebene mittels ELISA untersucht. Der kurzfristige LPS-Reiz induzierte in den KC der „LPS-Ratten“ eine signifikant schwächere TNF α - und IL-6-Proteinfreisetzung als in den KC der Kontrollratten. In den „LPS-Ratten“ war die IL-6-Proteinfreisetzung der mit LPS stimulierten Zellen in einigen Versuchen geringer als die Freisetzung in den unbehandelten Kontrollen, d.h. es fand eine – wenn auch geringfügige - Inhibition durch LPS statt (Abb. 18). Die durch den kurzfristigen LPS-Reiz induzierten Effekte auf die Zytokinexpression von TNF α und IL-6 waren damit sowohl auf mRNA- (vgl. Abb. 17) als auch auf Proteinebene (Abb. 18) in den „LPS-Ratten“ signifikant schwächer als in den Kontrollratten.

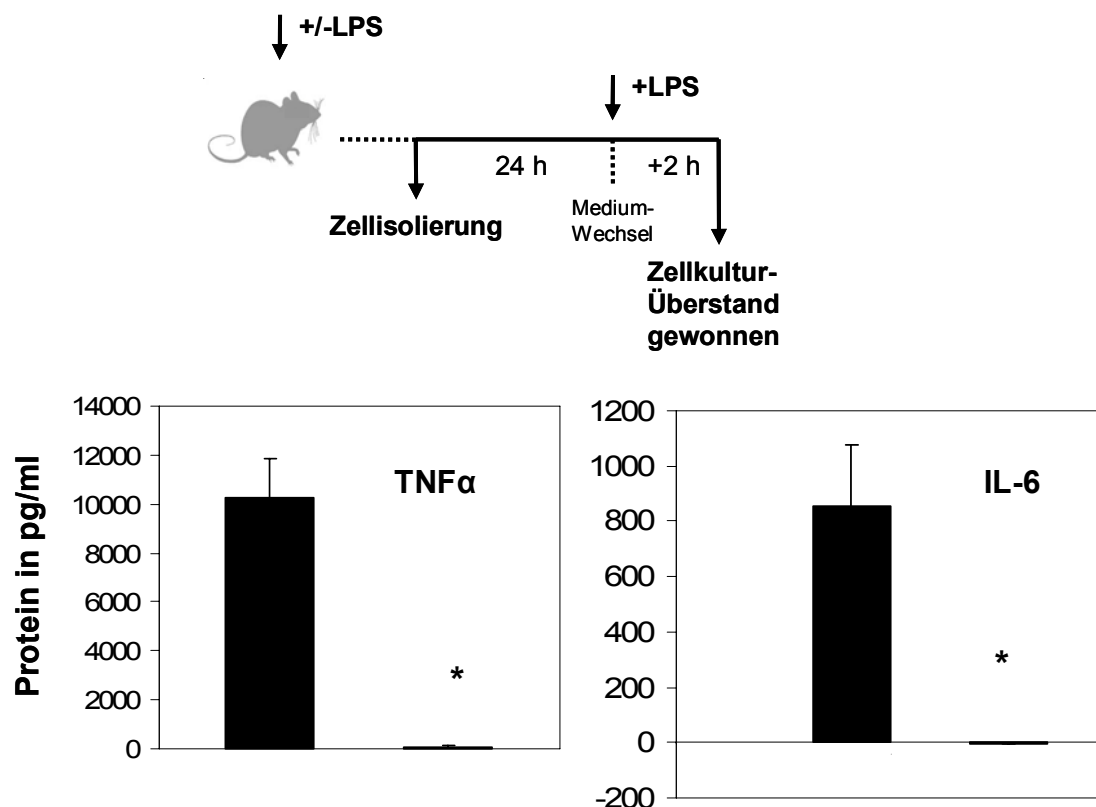


Abb. 18. Stimulierbarkeit der TNF α - und IL-6-Proteinfreisetzung durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus Kontrollratten und „LPS-Ratten“. Die Versuche wurden durchgeführt wie in Abb. 17 beschrieben. Nach 2 h wurden – parallel zum Abkratzen der Zellen – die Überstände abgenommen. Im Zellkulturmedium wurden die Proteinmengen mittels ELISA bestimmt. Es ist die LPS-induzierte Proteinfreisetzung in der Kontrollgruppe (schwarz) der Freisetzung in der „LPS-Rattengruppe“ (grau) gegenübergestellt. Die Werte ergeben sich aus der Differenz von LPS-Wert und Kontrollwert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchen. * $p \leq 0,05$: signifikant unterschiedliche LPS-induzierte TNF α - und IL-6-Proteinfreisetzung in den KC aus Kontrollratten im Vergleich zu KC aus „LPS-Ratten“ (Student's Test für ungepaarte Proben).

4.2.2 Einfluss einer längerfristigen LPS-Vorbehandlung *in vitro* auf die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Expression von TNF α , IL-1 β und IL-6

Die kurzfristige Stimulation mit LPS induzierte die mRNA-Expression und Proteinfreisetzung von TNF α und IL-6 in den „LPS-Ratten“ signifikant schwächer als in den Kontrollratten (vgl. 4.2.1). Im Weiteren wurde untersucht, ob auch die längerfristige *in-vitro*-LPS-Vorbehandlung isolierter KC die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Zytokinexpression beeinflusst. Der kurzfristige LPS-Reiz induzierte in den Kontrollratten die TNF α - und die IL-6-mRNA-Expression in LPS-vorbehandelten KC tendenziell schwächer als in unbehandelten KC. Die LPS-induzierte IL-1 β -mRNA-Expression wurde in den LPS-vorbehandelten KC tendenziell stärker als in den unbehandelten KC der Kontrollratte exprimiert (Abb. 19). Parallel wurde die durch den kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Zytokinexpression auf Proteinebene mittels ELISA ermittelt. In den Kontrollratten induzierte der kurzfristige LPS-Reiz in den LPS-vorbehandelten KC eine signifikant

geringere TNF α - und IL-6-Proteinfreisetzung als in den unbehandelten KC (Abb. 20). Durchschnittlich wurde in den LPS-vorbehandelten KC fünfte weniger TNF α -Protein freigesetzt. Diese Effekte hatten sich auf mRNA-Ebene nur tendenziell gezeigt.

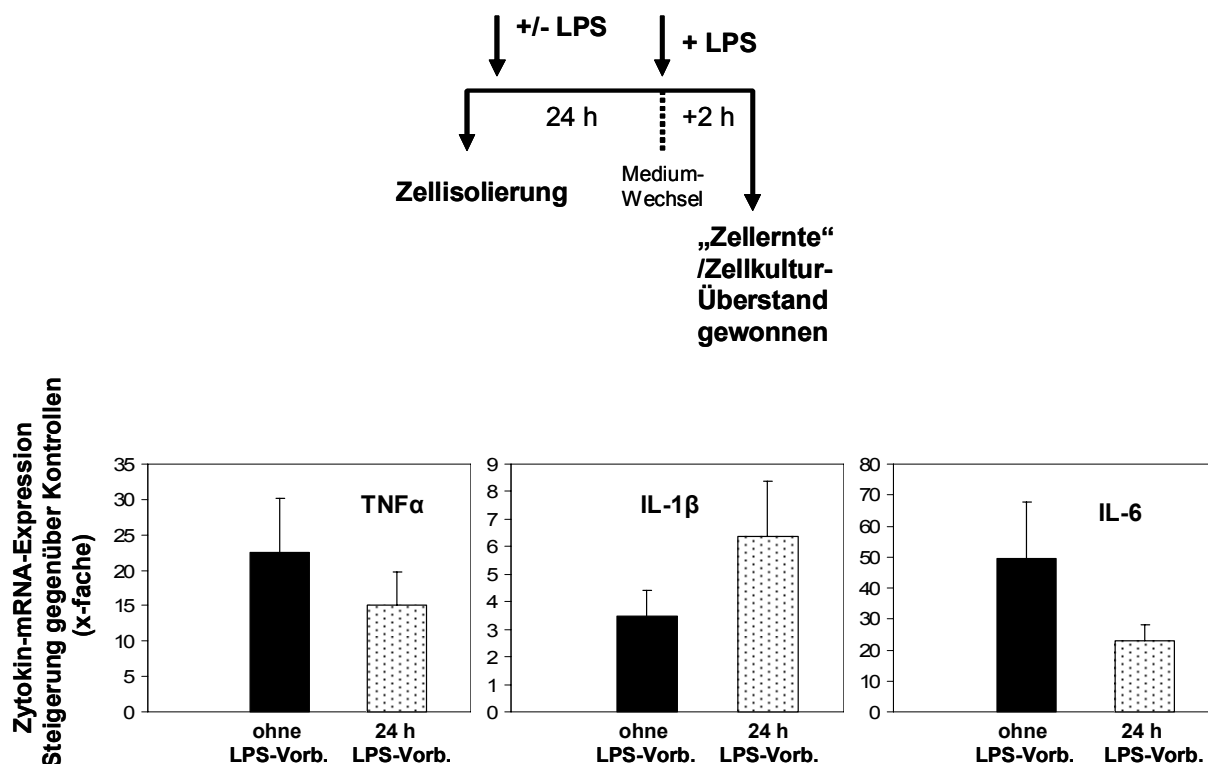


Abb. 19. Stimulierbarkeit der TNF α -, IL-1 β - und IL-6-mRNA-Expression durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus Kontrollratten nach 24-stündiger LPS-Vorbehandlung. Nach 24-stündiger Kultivierung mit oder ohne LPS (1 ng/ml) wurden die KC nach einem Mediumwechsel mit LPS (1 ng/ml) für weitere 2 h stimuliert. Die Zytokin-mRNA-Expression wurde mittels LC-PCR im Verhältnis zur β -Aktin-mRNA-Expression quantifiziert. Die LPS-induzierte Expression der Zytokin-mRNA in unbehandelten (ohne LPS-Vorb.) und mit LPS (1ng/ml) über 24 h vorbehandelten Zellen (24 h LPS-Vorb.) ist dargestellt. Die durch LPS-induzierte Expression der Zytokin-mRNA wurde als x-fache Steigerung in Bezug auf die unstimuliert belassenen Kontrollen berechnet. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchen.

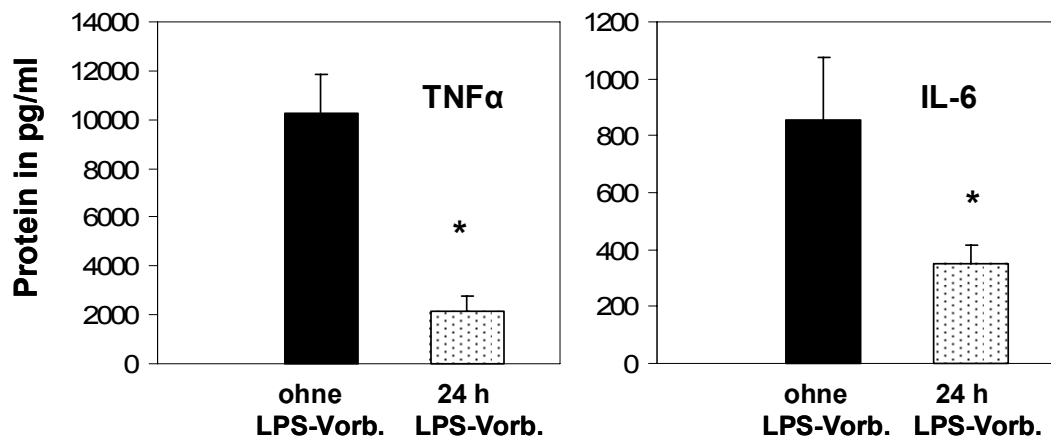


Abb. 20. Stimulierbarkeit der TNF α - und IL-6-Proteinfreisetzung durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus Kontrollratten nach 24-stündiger LPS-Vorbehandlung. Die Versuche wurden durchgeführt wie in Abb. 19 beschrieben. Nach 2 h wurden – parallel zum Abkratzen der Zellen – die Überstände abgenommen und die Proteinmenge mittels ELISA bestimmt. Die LPS-induzierte Proteinsynthese in unbehandelten (ohne LPS-Vorb.) und mit LPS (1 ng/ml) über 24 h vorbehandelten Zellen (24 h LPS-Vorb.) ist dargestellt. Die Werte ergeben sich aus der Differenz von LPS-Wert und Kontrollwert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchen. * $p \leq 0,05$: signifikant geringere LPS-induzierte Proteinfreisetzung in LPS-vorbehandelten als in unbehandelten KC (Student's Test für gepaarte Proben).

Auch die aus den „LPS-Ratten“ isolierten und zusätzlich *in vitro* mit LPS behandelten KC wurden kurzfristig mit LPS stimuliert. Der kurzfristige LPS-Reiz induzierte in den LPS-vorbehandelten KC die TNF α -mRNA-Expression tendenziell und die IL-6-mRNA-Expression signifikant geringer als in den unbehandelten KC aus „LPS-Ratten“. Die durch den kurzfristigen LPS-Reiz induzierte IL-1 β -mRNA-Expression war ähnlich in den LPS-vorbehandelten und in den unbehandelten KC aus „LPS-Ratten“ (Abb. 21). In den aus den „LPS-Ratten“ isolierten KC war die LPS-induzierte TNF α -Proteinfreisetzung in LPS-vorbehandelten und unbehandelten KC nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 22). Bezüglich der IL-6-Proteinfreisetzung wurde innerhalb der 2 h sowohl in den LPS-vorbehandelten als auch in den unbehandelten KC der „LPS-Ratte“ keine LPS-induzierte IL-6-Proteinfreisetzung gegenüber den jeweiligen Kontrollen beobachtet, zum Teil fand eine - wenn auch geringfügige - Inhibition durch LPS statt (Abb. 22).

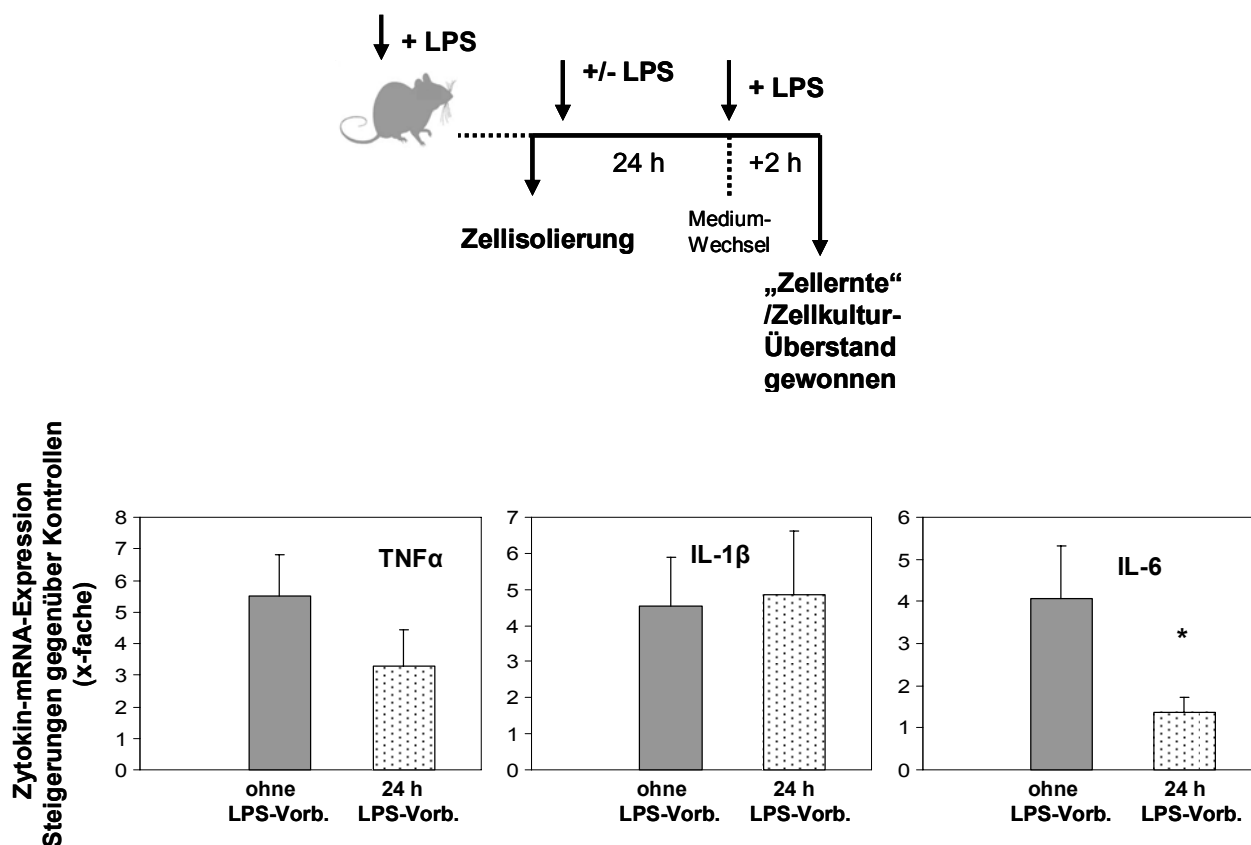


Abb. 21. Stimulierbarkeit der TNF α -, IL-1 β - und IL-6-mRNA-Expression durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus „LPS-Ratten“ nach 24-stündiger LPS-Vorbehandlung. Der Versuch wurde durchgeführt wie in Abb. 19 beschrieben; allerdings mit KC von Ratten, denen 12 - 14 h vor der Isolierung LPS in einer Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert wurde. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus fünf (TNF α und IL-6) und vier (IL-1 β) Versuchen. * $p \leq 0,05$: signifikant unterschiedliche LPS-induzierte Zytokin-mRNA-Expression in über 24 h mit LPS vorbehandelten KC (24 h LPS-Vorb.) gegenüber unbehandelten KC (ohne LPS-Vorb.) (Student's Test für gepaarte Proben).

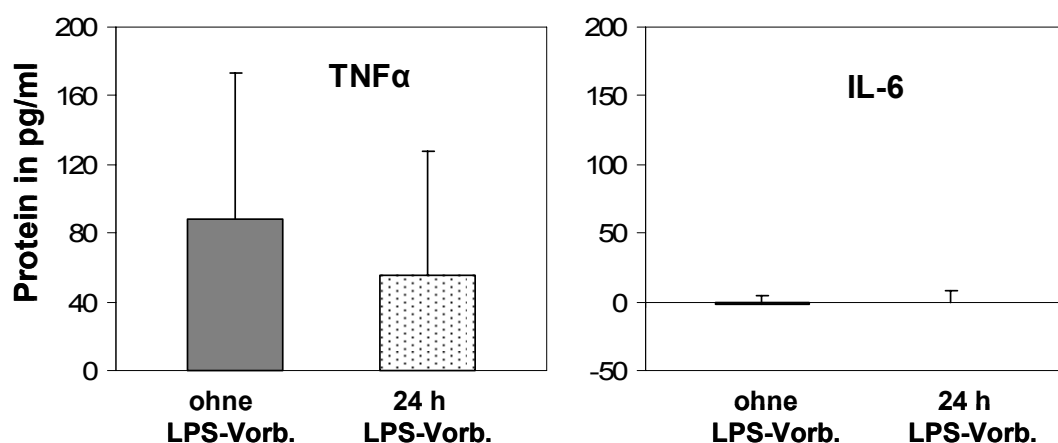


Abb. 22. Stimulierbarkeit der TNF α und IL-6-Proteinfreisetzung durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus „LPS-Ratten“ nach 24-stündiger LPS-Vorbehandlung. Der Versuch wurde durchgeführt wie in Abb. 20 beschrieben; allerdings mit KC von Ratten, denen 12 - 14 h vor der Isolierung LPS in einer Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert wurde. Die LPS-induzierte Proteinsynthese in unbehandelten (ohne LPS-Vorb.) und mit LPS (1 ng/ml) über 24 h vorbehandelten Zellen (24 h LPS-Vorb.) ist dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus fünf Versuchen.

4.2.3 Einfluss einer längerfristigen LPS-Vorbehandlung *in vivo* auf die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Expression von IL-10

Der kurzfristige LPS-Reiz induzierte die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α - und IL-6 sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene in den KC der „LPS-Ratte“ signifikant schwächer als in den Kontrollratten (vgl. 4.2.1). Die LPS-induzierte Stimulierbarkeit der IL-10-mRNA ist gezeigt [THOMPSON et al. 1998]. Es sollte im Weiteren untersucht werden, ob die *in vivo* generierte Entzündung auch die durch den kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Expression des antiinflammatorischen IL-10 beeinflusst. Es wurden dieselben Proben verwendet, die auch für die Bestimmung der proinflammatorischen Zytokine verwendet wurden. Während der kurzfristige LPS-Reiz die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6 anders als diejenige von IL-1 β in der „LPS-Ratte“ signifikant weniger stimulierte, waren die LPS-induzierten Effekte auf den Anstieg der Expression der IL-10-mRNA in beiden Versuchsgruppen ähnlich (Abb. 23).

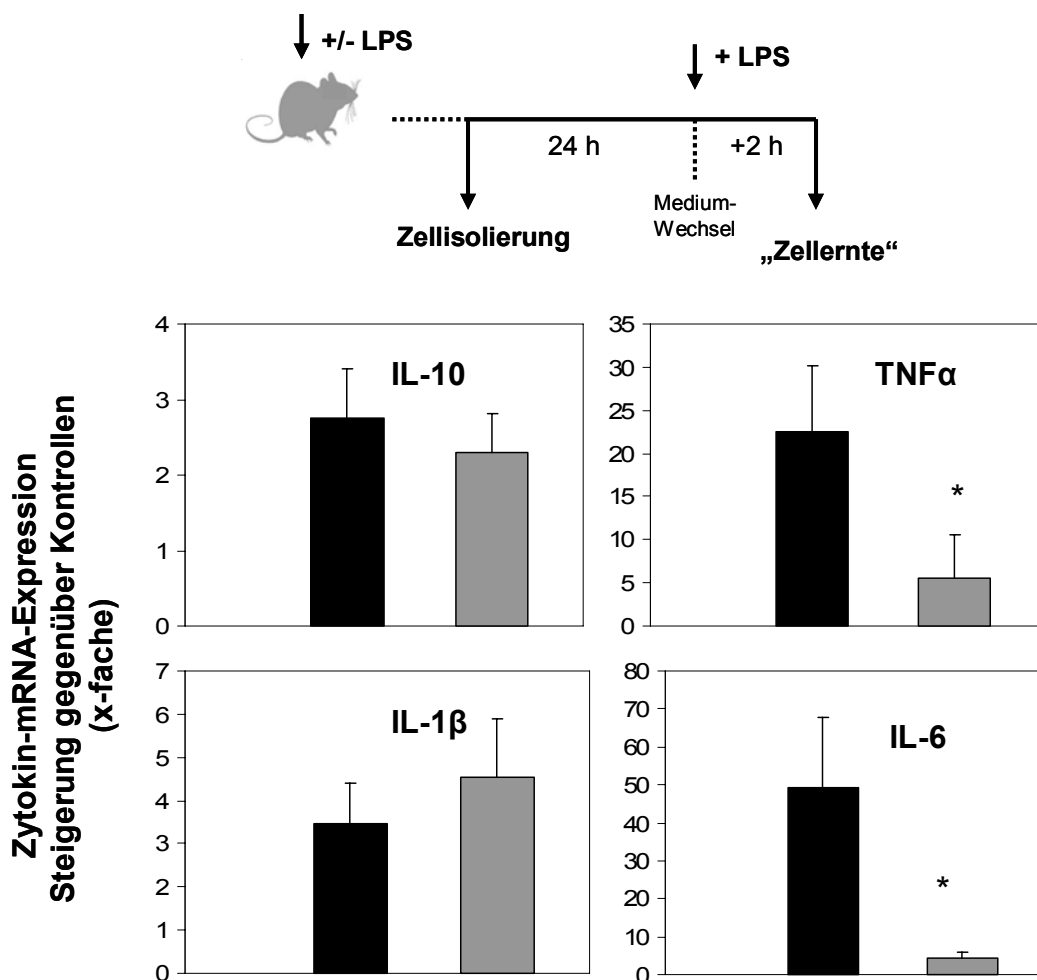


Abb. 23. Stimulierbarkeit der IL-10-, TNF α -, IL-1 β - und IL-6-mRNA-Expression durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus Kontrollratten und „LPS-Ratten“. Der Versuch wurde durchgeführt wie in Abb. 17 beschrieben; die Werte der proinflammatorischen Zytokine sind der Abb. 17 entnommen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier und drei (IL-10) Versuchen. Die LPS-induzierte Expression der Zytokin-mRNA in den Kontrollratten (schwarz) ist der LPS-induzierten Expression in den „LPS-Ratten“ (grau) gegenübergestellt. * $p \leq 0,05$: signifikant unterschiedliche LPS-induzierte Expression in den KC aus Kontrollratten gegenüber KC aus „LPS-Ratten“ (Student's t-Test für ungepaarte Proben).

Die innerhalb von 2 h durch den kurzfristigen LPS-Reiz induzierte IL-10-Expression wurde ebenfalls auf Proteinebene mittels ELISA bestimmt. Wie auch auf mRNA-Ebene beobachtet, induzierte 1 ng/ml LPS das IL-10-Protein in den aus Kontrollratten und „LPS-Ratten“ isolierten KC ähnlich stark (Abb. 24). Dabei muss erwähnt werden, dass 1 ng/ml LPS die IL-10-Protein-freisetzung sowohl in den KC der Kontroll- als auch in den KC der „LPS-Ratten“ induzierte, die Induktion war bezogen auf die jeweiligen Kontrollen jedoch nicht signifikant.

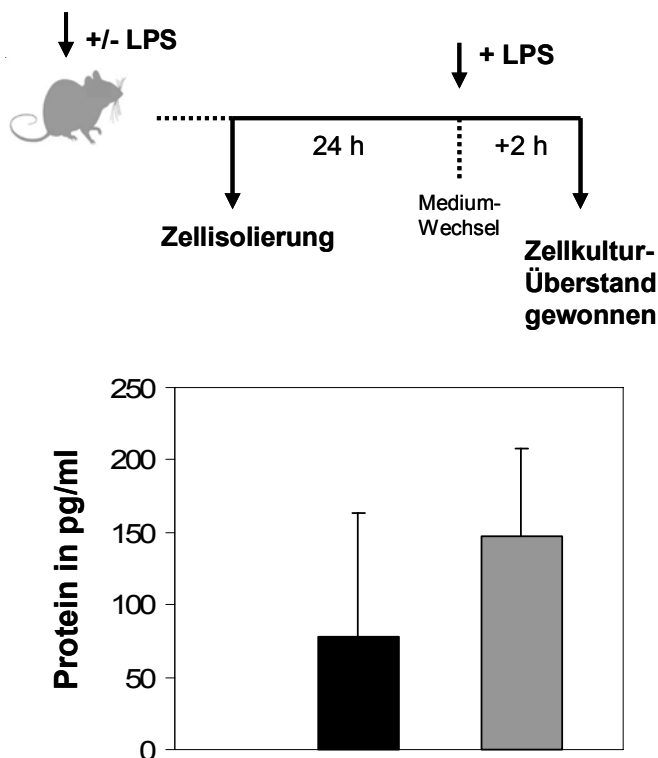


Abb. 24. Stimulierbarkeit der IL-10-Proteinfreisetzung durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus Kontrollratten und „LPS-Ratten“. Der Versuch wurde durchgeführt wie in Abb. 18 beschrieben; die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei Versuchen. Es ist die LPS-induzierte Proteinfreisetzung in der Kontrollgruppe (schwarz) der Freisetzung in der „LPS-Rattengruppe“ (grau) gegenübergestellt.

4.2.4 Einfluss einer längerfristigen LPS-Vorbehandlung *in vitro* auf die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Expression von IL-10

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob auch die längerfristige *in-vitro*-LPS-Vorbehandlung isolierter KC die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierte IL-10-Expression beeinflusst. Die aus der Kontrollratte isolierten KC wurden kurzfristig mit LPS stimuliert und die LPS-induzierte Zytokinexpression wurde bestimmt. Der kurzfristige LPS-Reiz induzierte die IL-10-mRNA-Expression in LPS-vorbehandelten und unbehandelten KC der Kontrollratte nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 25A).

Auch die aus der „LPS-Ratte“ isolierten KC wurden kurzfristig mit LPS stimuliert. Der kurzfristige LPS-Reiz induzierte in den zusätzlich *in vitro* mit LPS behandelten KC eine signifikant höhere

IL-10-mRNA-Expression als in den unbehandelten KC aus „LPS-Ratten“ (Abb. 25B). Für IL-6 hatte sich gegenläufig eine signifikant geringere LPS-induzierte mRNA-Expression in den LPS-vorbehandelten KC aus „LPS-Ratten“ gezeigt (vgl. Abb. 21). Die durch den kurzfristigen LPS-Reiz induzierte IL-10-Proteinfreisetzung war in LPS-vorbehandelten und unbehandelten KC der Kontrollratte ähnlich (nicht gezeigt). In der „LPS-Ratte“ war die LPS-induzierte IL-10-Proteinfreisetzung in den LPS-vorbehandelten KC tendenziell geringer als in den unbehandelten KC (nicht gezeigt).

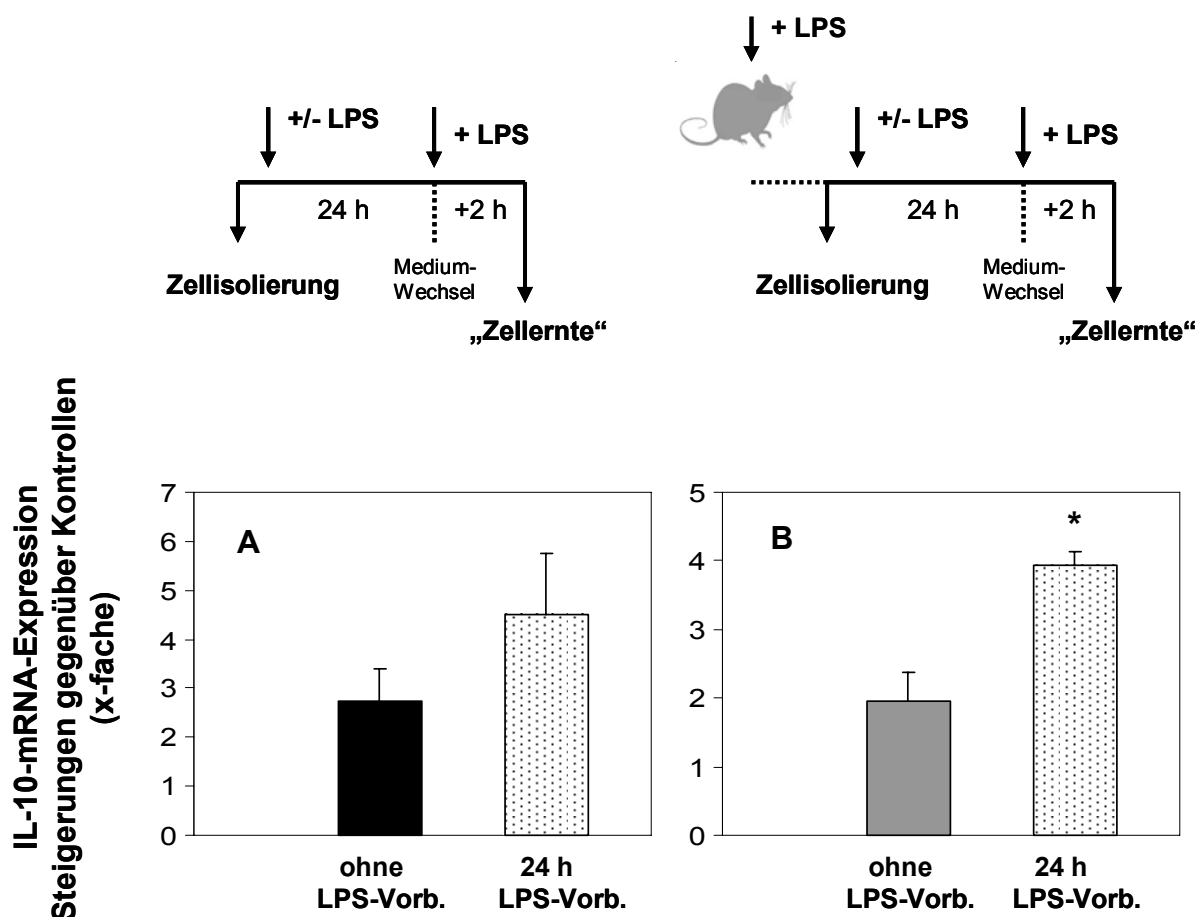


Abb. 25. Stimulierbarkeit der IL-10-mRNA-Expression durch einen kurzfristigen LPS-Reiz in KC aus Kontrollratten (A) und „LPS-Ratten“ (B) nach 24-stündiger LPS-Vorbehandlung. Die Versuche wurden wie in den Abb. 19 und 21 beschrieben durchgeführt. Die LPS-induzierte Expression der Zytokin-mRNA in unbehandelten (ohne LPS-Vorb.) und mit LPS (1 ng/ml) über 24 h vorbehandelten Zellen (24 h LPS-Vorb.) ist dargestellt. Die LPS-induzierte Expression der Zytokin-mRNA wurde als x-fache in Bezug auf die unstimuliert belassenen Kontrollen berechnet. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei und vier Versuchen. * $p \leq 0,05$: signifikant unterschiedliche LPS-induzierte Expression in über 24 h mit LPS vorbehandelten als in unbehandelten KC aus „LPS-Ratten“ (Student's t-Test für ungepaarte Proben).

5. DISKUSSION

Die Leber spielt eine entscheidende Rolle im Intermediärstoffwechsel des Organismus und ist an vielfältigen Aufgaben der zellulären Immunabwehr beteiligt, die durch komplexe Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Leberzellen realisiert werden. Verschiedene schädigende Reize wie z.B. bakterielle und virale Infektionen stören die Homöostase des Organismus, so dass Abwehrmechanismen in Form von Entzündungsprozessen mit dem Ziel ausgelöst werden, das ursächliche Agens zu beseitigen. In der Leber nehmen die Antigen-präsentierenden KC, die sich innerhalb der Lebersinusoide befinden [BURT et al. 1993], als Gewebsmakrophagen entscheidende Aufgaben der angeborenen Immunantwort wahr. Die als Endotoxine bezeichneten inflammatorischen Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteile der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und können im Organismus verschiedene immunologische Reaktionen wie Fieber, Blutdruckabfall, disseminierte intravasale Gerinnung und Organschäden mit der möglichen Konsequenz eines Multiorganversagens im septischen Schock auslösen [HATAO et al. 2005]. In der Leber reguliert LPS – direkt oder indirekt – Abwehrreaktionen der verschiedenen Leberzelltypen. Die residenten KC sind im Gegensatz zu den Hepatozyten, die keine direkte Reaktivität auf LPS zeigen, direkt durch LPS stimulierbar und setzen nach ihrer Aktivierung ein breites Spektrum löslicher Mediatoren wie Zytokine, Prostaglandine und reaktive Sauerstoffspezies frei [DECKER 1990]. Die KC, die der hauptsächliche Syntheseort für lösliche Mediatoren sind, modulieren über die Synthese dieser Mediatoren wichtige Abwehrreaktionen benachbarter Zellen in der Leber [KMIEC 2001]. So regulieren KC in den Hepatozyten über die Prostaglandinfreisetzung die Glykogenolyse [FENNEKOHLE et al. 1999] und induzieren über die freigesetzten proinflammatorischen Zytokine die Produktion von Akut-Phase-Proteinen [HEINRICH et al. 1990].

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass die Simulation von Entzündungsbedingungen durch eine *in-vivo*-LPS-Behandlung von Ratten eine veränderte Reaktivität der verschiedenen Zelltypen der Leber zur Folge hat. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten z.B., dass eine *in-vivo*-Behandlung von Ratten mit LPS eine *de-novo*-Expression von Anaphylatoxin-C5a-Rezeptoren in Hepatozyten bewirkt (vgl. Einleitung) [KOLEVA et al. 2002]. Es ist bekannt, dass eine repetitive Behandlung mit LPS in Monozyten und Makrophagen zu einer „Deaktivierung“ oder auch „Endotoxintoleranz“ der Zellen führen kann (vgl. Einleitung) [CAVAILLON 1995]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Entzündungssituation *in vivo* und *in vitro* simuliert. Die experimentelle Entzündung *in vivo* wurde dabei durch eine intraperitoneale LPS-Injektion der Ratten in einer Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht 12 -14 h vor der Präparation erreicht („LPS-Ratten“), wobei die LPS-Konzentration in Anlehnung an frühere Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe gewählt wurde [KOLEVA et al. 2002]. Beim gesunden Menschen stellt die intakte Darmmukosa eine effektive Barriere dar, so dass nur geringe LPS-Mengen von Darm-

assoziierten gramnegativen Bakterien in die Zirkulation gelangen. Unter pathologischen Bedingungen wie im Rahmen einer Sepsis können im Blutstrom LPS-Spiegel von oft mehr als 400 pg/ml gemessen werden (vgl. Einleitung) [OPAL et al. 1999]. In der vorliegenden Arbeit wurde die experimentelle Entzündung *in vitro* durch eine längerfristige Behandlung der kultivierten KC mit LPS in einer damit pathophysiologisch relevanten Konzentration von 1 ng/ml erreicht (LPS-behandelte KC). Es konnte gezeigt werden, dass die *in vivo* und *in vitro* generierte Entzündung sowohl die basale Zytokinexpression in den KC beeinflusste (vgl. 5.1) als auch die Reaktivität der KC auf einen kurzfristigen LPS-Reiz (vgl. 5.2) veränderte.

5.1 Veränderte basale Zytokinexpression in Kupfferzellen unter Entzündungsbedingungen *in vivo* und *in vitro*

Die durch die LPS-Behandlung *in vivo* generierte Entzündung beeinflusste das basale Expressionsmuster der Zytokine: so wurde eine geringere basale Expression der proinflammatorischen Zytokine und parallel dazu eine nicht verminderte bzw. gesteigerte basale Expression des antiinflammatorischen IL-10 unter Entzündungsbedingungen beobachtet (Abb. 5; Abb. 6; Abb. 11; Abb. 12; Abb. 13). Die basale Produktion des proinflammatorischen Prostanoids PGD₂ war in KC aus Kontroll- und „LPS-Ratten“ nicht signifikant unterschiedlich (nicht gezeigt).

Auch unter *in-vitro*-Entzündungsbedingungen, die durch eine längerfristige LPS-Behandlung der kultivierten KC simuliert wurden, konnte eine geringere basale Expression der proinflammatorischen Zytokine beobachtet werden (Abb. 7; Abb. 8; Abb. 9; Abb. 10). IL-10 wurde im Gegensatz dazu unter Entzündungsbedingungen *in vitro* in KC aus Kontrollratten nicht vermindert exprimiert (Abb. 14). Die aus der „LPS-Ratte“ isolierten und zusätzlich *in vitro* mit LPS behandelten KC exprimierten allerdings nach 24 h signifikant weniger IL-10-mRNA und –Protein als die unbehandelten KC aus „LPS-Ratten“ (Abb. 15). Beim Vergleich der PGD₂-Produktion unter den Entzündungsbedingungen *in vitro* produzierten die KC aus „LPS-Ratten“ signifikant weniger PGD₂ als die KC aus Kontrollratten (Abb. 16).

5.1.1 Einfluss einer Entzündung *in vivo* und *in vitro* auf die basale Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-6 und IL-1 β in Kupfferzellen

KC aus „LPS-Ratten“ exprimierten basal signifikant weniger TNF α -mRNA und –Protein und tendenziell weniger IL-1 β -mRNA als KC aus Kontrollratten. Die basale IL-6-Expression war auf mRNA- und Proteinebene zwischen „LPS-Ratten“ und Kontrollratten nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 5; Abb. 6). Kultivierte, unstimulierte KC weisen eine schwach ausgeprägte TNF α - [GREWE et al. 1994] und IL-6-mRNA-Expression sowie eine deutlich ausgeprägte basale IL-1 β -mRNA-Expression auf [MÄCK et al. 2001a]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine ähnlich starke basale mRNA-Expression der entsprechenden Zytokine in unstimulierten KC aus

Kontrollratten gezeigt (Abb. 5). Die KC aus „LPS-Ratten“ exprimierten basal sowohl nach 24 h als auch nach 48 h signifikant weniger TNF α -mRNA als die unbehandelten KC aus Kontrollratten (Abb. 5). Im Gegensatz dazu wiesen FLOHE et al. [1999] weder im Lebergewebe von Kontrollratten noch in der Leber von Ratten, die nach einem Schema *in vivo* repetitiv mit LPS i.p. behandelt wurden, eine TNF α -mRNA-Expression nach. Aufgrund der geringen TNF α -Expression in unbehandelten KC könnte der fehlende Nachweis bei FLOHE et al. [1999] im Lebergewebe auf die weniger empfindliche Nachweismethode mittels semiquantitativer PCR im Vergleich zu der in der eigenen Arbeit angewandten quantitativen RealTime-PCR am LightCycler zurückgeführt werden. Parallel zur geringeren basalen TNF α -Expression auf mRNA-Ebene produzierten die KC aus „LPS-Ratten“ nach 24 h basal signifikant weniger TNF α -Protein als die KC aus Kontrolltieren (Abb. 6). In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigten AYALA et al. [1992] für KC von Mäusen, die 24 h nach der *in-vivo*-Induktion einer Sepsis gewonnen wurden, eine ähnlich starke oder geringere TNF α -Proteinexpression gegenüber der Expression in Kontrolltieren.

Die IL-1 β -mRNA wurde in den KC aus „LPS-Ratten“ entsprechend der TNF α -Expression tendenziell weniger als in KC aus Kontrollratten exprimiert (Abb. 5). Allerdings war der Unterschied – wahrscheinlich aufgrund der relativ streuenden Kontrollwerte – nicht signifikant. Das IL-1 β -Protein wurde aufgrund des bekannten Phänomens, dass keine Freisetzung des reifen 17 kDa IL-1 β -Proteins aus kultivierten KC stattfindet, nicht untersucht (vgl. Ergebnisteil) [MÄCK et al. 2001b]. Für Mäusekupferzellen, die 24 h nach *in-vivo*-Induktion einer Sepsis gewonnen wurden, wurde eine ähnliche bzw. geringere IL-1-Proteinfreisetzung als in KC aus Kontrollmäusen beschrieben [AYALA et al. 1992]. Die IL-6-mRNA- und -Proteinexpression war zwischen den „LPS-Ratten“ und den Kontrolltieren im Gegensatz zur signifikant geringeren TNF α - und tendenziell geringeren IL-1 β -mRNA-Expression nicht unterschiedlich (Abb. 5 und 6). In Übereinstimmung beobachteten FLOHE et al. [1999] ähnlich geringe IL-6-mRNA-Level im Lebergewebe von Kontroll- und *in vivo* mit LPS behandelten Ratten. Mäusekupferzellen, die 24 h nach *in-vivo*-Induktion einer Sepsis gewonnen wurden, produzierten ähnliche bzw. geringere IL-6-Proteinmengen als die KC von Kontrolltieren [AYALA et al. 1992].

Als Antwort des Organismus auf Störungen der Homöostase wird die wichtige Akut-Phase-Reaktion mit dem Ziel die Entzündung zu begrenzen und die normalen Organismusfunktionen wiederherzustellen induziert (vgl. Einleitung). Die positiven Akut-Phase-Proteine, bei denen es sich vielfach um Protease-Inhibitoren zur Eindämmung der Gewebeschädigung handelt, werden durch TNF α und IL-1 β , in erster Linie aber durch IL-6 stimuliert [HEINRICH et al. 1990]. IL-6 stimuliert als Hauptmediator ein breiteres und anderes Spektrum an APP [CASTELL et al. 1989]. Im Gegensatz zur verminderten basalen Expression von TNF α und IL-1 β wurde IL-6, der Hauptmediator der Akut-Phase-Reaktion, in der vorliegenden Arbeit unter der *in vivo* simulierten Entzündung basal

nicht vermindert exprimiert. Eine Erklärung dafür könnte die wichtige Rolle von IL-6 im Rahmen der Akut-Phase-Reaktion unter Entzündungsbedingungen sein.

Auch die durch eine längerfristige *in-vitro*-Behandlung der kultivierten KC mit LPS (1 ng/ml) generierte Entzündung beeinflusste das basale Expressionmuster der proinflammatorischen Zytokine. TNF α und IL-1 β wurden auf mRNA-Ebene in den über 24 h bzw. 48 h mit LPS behandelten KC signifikant weniger als in den unbehandelten KC exprimiert. Dieser Effekt zeigte sich sowohl für KC aus Kontrollratten als auch für KC aus „LPS-Ratten (Abb. 7; Abb. 9). Die Kinetik der LPS-induzierten TNF α -mRNA-Expression wurde in Arbeiten der eigenen [MÄCK et al. 2001a] und anderer Arbeitsgruppen [GREWE et al. 1994] beschrieben. Nach 90 min wurde die maximale durch 1 ng/ml LPS induzierte Expression erreicht, nach 7,5 h war die Induktion kaum noch nachweisbar [MÄCK et al. 2001a]. Auch für die durch LPS (1 ng/ml) induzierte IL-1 β -mRNA wurde die maximale Expression nach 90 min über einen Zeitraum von ca. 5 h beobachtet [MÄCK et al. 2001a]. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete signifikant geringere TNF α - und IL-1 β -mRNA-Expression in den über 24 h bzw. 48 h mit LPS behandelten Zellen lag also außerhalb des Zeitfensters der LPS-Induktion der mRNA-Expression und zeigte eine Hemmung der Expression unter der langfristigen LPS-Behandlung. Auf Proteinebene exprimierten die über 24 h LPS-behandelten KC der Kontrollratte parallel zur mRNA signifikant weniger TNF α als die unbehandelten KC (Abb. 8). Im Gegensatz zu den hier gezeigten Befunden wurde für kultivierte humane Blutmonozyten von gesunden Probanden kein Unterschied in der TNF α -Protein-Sekretion zwischen über 24 h mit LPS behandelten und unbehandelten Zellen gezeigt [SEATTER et al. 1995]. Die fehlende Übereinstimmung mit den eigenen Beobachtungen könnte einerseits durch Spezies- oder Gewebe-spezifische Unterschiede, andererseits durch Unterschiede im untersuchten Zeitraum erklärt werden. Während SEATTER et al. [1995] die Proteinexpression nach 24 h untersuchten, wurde in der eigenen Arbeit die Proteinbestimmung schon 2 h nach dem Mediumwechsel durchgeführt. Für die „LPS-Ratte“ war der inhibitorische Effekt auf die TNF α -Expression auf Proteinebene - wahrscheinlich aufgrund der schon durch die *in-vivo*-LPS-Behandlung stark inhibierten Proteinfreisetzung (Abb. 6) - nicht nachweisbar (Abb. 10).

Während die IL-6-Expression in den längerfristig LPS-behandelten und unbehandelten KC der Kontrollratte auf mRNA-Ebene nicht unterschiedlich war (Abb. 7), zeigte sich auf Proteinebene eine signifikant höhere Expression in den LPS-behandelten KC nach einem Mediumwechsel (Abb. 8). Dieses Ergebnis könnte die Tatsache unterstreichen, dass KC nach einer LPS-Behandlung über einen Zeitraum von 24 h und länger das IL-6 Protein kontinuierlich freisetzen [BUSAM et al. 1990]. Für die LPS-behandelten KC der „LPS-Ratte“ zeigte sich nach 48 h auf mRNA-Ebene eine signifikant geringere IL-6-Expression als in den unbehandelten KC der „LPS-Ratte“ (Abb. 9). Die IL-6-Proteinexpression war nicht unterschiedlich (Abb. 10).

In der vorliegenden Arbeit wurde die TNF α -Expression sowohl unter der experimentell *in vivo* (i.p. LPS-Behandlung der Ratte) als auch unter der *in vitro* (längerfristige LPS-Behandlung der kultivierten KC) simulierten Entzündung basal vermindert im Vergleich zur Expression unter Normalbedingungen exprimiert. Das proinflammatorische TNF α ist neben anderen Zytokinen ein Vermittler des Endotoxinschocks [SIMPSON et al. 1997], in vielen Modellen experimenteller Leberschädigung wird TNF α als Hauptmediator derselben beschrieben [BRADHAM et al. 1998]. Die hier beobachtete verminderte basale Expression von TNF α unter Entzündungsbedingungen *in vivo* und *in vitro* könnte ein notwendiger Schutzmechanismus sein, um die durch LPS ausgelöste Entzündung zu begrenzen, damit eine unkontrollierte und die Leber schädigende Entzündungsreaktion verhindert werden kann.

5.1.2 Einfluss einer Entzündung *in vivo* und *in vitro* auf die basale Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in Kupferzellen

Das bedeutende antiinflammatorische Potential von IL-10 hat verschiedene klinische Studien bezüglich der Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen wie entzündliche Darmerkrankungen, rheumatische Arthritis und Psoriasis initiiert [GRÜTZ 2005]. IL-10 besitzt neben anderen antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-4, IL-13 und TGF- β_1 Monozyten und Makrophagen deaktivierende Eigenschaften und greift auf vielfältige Art und Weise regulierend in den Inflammationsprozess ein [THOMPSON et al. 1998]. In unstimulierten KC der Ratte wurde eine niedrige basale IL-10-mRNA-Expression beobachtet [THOMPSON et al. 1998]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine schwache basale IL-10-mRNA-Expression in unstimulierten KC gezeigt (Abb. 11). Die TNF α -Expression in KC aus „LPS-Ratten“ war geringer als in KC aus Kontrollratten, diese Tendenz zeigte sich auch für die IL-1 β -mRNA-Expression nicht jedoch für die IL-6-Expression (Abb. 5; Abb. 6). Das antiinflammatorische IL-10, das möglicherweise an der verminderten Expression von TNF α beteiligt sein könnte, wurde basal sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in KC aus Kontroll- und aus „LPS-Ratten“ ähnlich stark exprimiert (Abb. 11; Abb. 12). Übereinstimmend mit der eigenen Beobachtung fanden FLOHE et al. [1999] ebenfalls keine Unterschiede bezüglich der IL-10-mRNA-Expression in Leberbiopsien von Kontrollratten und repetitiv *in vivo* i.p. mit LPS behandelten Ratten.

Es wurde eine Proteinbestimmung zu einem früheren Zeitpunkt vorgenommen. Dafür wurden die Kulturüberstände von den frisch kultivierten KC nach 24 h gewonnen, um auch die innerhalb der ersten 24 h nach der Präparation produzierte Proteinmenge zu bestimmen: die KC aus „LPS-Ratten“ setzten innerhalb dieser ersten 24 h nach der Kultivierung sowohl signifikant weniger TNF α - als auch signifikant weniger IL-6-Protein frei und produzierten innerhalb dieses Zeitraumes signifikant mehr IL-10-Protein als die KC aus Kontrollratten (Abb. 13). Die IL-10-mRNA-Expression, die ebenfalls nach 24-stündiger Kultivierungszeit bestimmt wurde, war - wie

beschrieben - nicht unterschiedlich in KC aus Kontroll- und „LPS-Ratten“ (Abb. 11). Die fehlende Übereinstimmung der mRNA- und –Proteinexpression könnte mit dem Zeitpunkt der mRNA-Bestimmung erklärt werden: eine eventuell ebenfalls stärkere IL-10-mRNA-Expression in Folge der *in vivo* generierten Entzündung könnte zu einem früheren nicht untersuchten Zeitpunkt stattgefunden haben. Die im Rahmen dieses Versuches beobachtete verminderte basale TNF α -Proteinfreisetzung in KC aus „LPS-Ratten“ entspricht den Ergebnissen der vorherigen Versuche (Abb. 6). In Peritonealmakrophagen der Maus hemmt rekombinantes Maus-IL-10 sowohl die LPS-induzierte TNF α -Produktion als auch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffzwischenprodukten [BOGDAN et al. 1991]. An der inhibitorischen Wirkung der *in-vivo*-LPS-Behandlung auf die TNF α -Proteinfreisetzung in der vorliegenden Arbeit könnte ebenfalls IL-10 beteiligt sein, die signifikant höhere basale IL-10-Proteinexpression in KC aus „LPS-Ratten“ weist darauf hin (Abb. 13). Weitere Untersuchungen mit inhibitorischen Antikörpern gegen IL-10 müssten zeigen, ob IL-10 tatsächlich an der Vermittlung des inhibitorischen Signals beteiligt ist. Für humane Blutmonozyten ist beschrieben, dass die Zugabe von monoklonalen neutralisierenden anti-IL-10-Antikörpern die LPS-induzierte Zytokinproduktion erhöht. Ein hemmender Einfluss von endogen gebildetem IL-10 auf die Zytokinproduktion wird daher postuliert [DE WAAL et al. 1991]. Abweichend von den vorherigen Ergebnissen (Abb. 6), die zu einem späteren Zeitpunkt der Kultivierung gewonnen wurden, wurde eine verminderte basale Freisetzung auch des IL-6-Proteins für die „LPS-Ratte“ innerhalb der ersten 24 h nach der Präparation im Vergleich zur Kontrollratte beobachtet (Abb. 13).

Die *in vitro* durch eine längerfristige LPS-Behandlung simulierte Entzündung führte zu einer geringeren basalen TNF α - und IL-1 β -mRNA-Expression (Abb. 7; Abb. 8) in den aus der Kontrollratte isolierten KC. Im Gegensatz dazu wurde die IL-10-mRNA in den LPS-behandelten KC der Kontrollratte nach 24 h tendenziell höher als in den unbehandelten KC der Kontrollratte und das Protein nicht unterschiedlich exprimiert (Abb. 14). THOMPSON et al. zeigten [1998], dass LPS die IL-10-mRNA-Expression in KC von unbehandelten Ratten innerhalb von 6 h maximal induzierte und diese Steigerung nach 24 h zwar etwas geringer aber immer noch vorhanden war. In den eigenen Versuchen war die Steigerung der Expression nur tendenziell vorhanden. Im Gegensatz zu den Versuchen bei THOMPSON et al. [1998] wurde in der vorliegenden Arbeit ein Mediumwechsel vorgenommen und die IL-10-mRNA-Expression 2 h nach der beendeten LPS-Behandlung bestimmt. Außerdem wurde mit einer deutlich geringeren LPS-Dosis von 1 ng/ml LPS im Gegensatz zur LPS-Konzentration von 1 μ g/ml bei THOMPSON et al. [1998] behandelt.

Die KC der „LPS-Ratte“ produzierten innerhalb der ersten 24 h nach der Präparation basal signifikant mehr IL-10-Protein als die KC aus der Kontrollratte. Nach 24 h exprimierten die aus der „LPS-Ratte“ isolierten und über 24 h zusätzlich *in vitro* mit LPS behandelten KC signifikant weniger IL-10-mRNA und –Protein als die unbehandelten KC aus „LPS-Ratten“ (Abb. 15). Die geringere

IL-10-Expression in den zusätzlich *in vitro* mit LPS behandelten KC der „LPS-Ratte“ könnte durch einen autoregulatorischen Mechanismus verursacht werden. So wird die LPS-induzierte IL-10-mRNA-Expression sowohl in humanen als auch in Mäuse-Kupfferzellen durch das IL-10-Protein über einen negativen Rückkopplungsmechanismus autoregulatorisch gehemmt [KNOLLE et al. 1998].

5.1.3 Einfluss einer Entzündung *in vivo* und *in vitro* auf die basale Expression von Prostaglandin₂ in Kupfferzellen

In der Rattenleber synthetisieren KC neben anderen nichtparenchymalen sinusoidalen Zellen Prostaglandine aus Derivaten der Arachidonsäure, unter ihnen ist PGD₂ das Hauptprodukt der KC [KUIPER et al. 1988]. Prostaglandine modulieren die Funktion von parenchymalen und nichtparenchymalen Zellen während Homöostase und Entzündung [CASTELEIJN et al. 1988], verschiedene Stimuli unter anderem Endotoxine induzieren ihre Synthese und Freisetzung. Von KC freigesetzte Prostaglandine erhöhen die Glykogenolyse in Hepatozyten, so dass Substrate für die inflammatorische Reaktion benachbarter Zellen bereitgestellt werden [FENNEKOHLE et al. 1999]. In der vorliegenden Arbeit war die basale PGD₂-Produktion sowohl nach 24 h als auch nach 48 h in den KC aus „LPS-Ratten“ und aus Kontrollratten nicht signifikant unterschiedlich (nicht gezeigt). Der fehlende Einfluss der *in-vivo*-LPS-Behandlung auf die Prostaglandinsynthese ist möglicherweise auf den Zeitpunkt der Prostaglandinbestimmung zurückzuführen. Da die Prostaglandin-vermittelten Umstellungen des Energiestoffwechsels relativ kurzfristige Abwehrreaktionen der Leber darstellen, könnte eine aufgrund der *in-vivo*-LPS-Behandlung möglicherweise veränderte Prostaglandinsynthese zu einem früheren nicht untersuchten Zeitpunkt stattgefunden haben.

Beim Vergleich der PGD₂-Produktion unter Entzündungsbedingungen *in vitro* produzierten die aus „LPS-Ratten“ isolierten und *in vitro* mit LPS behandelten KC signifikant weniger proinflammatorisches PGD₂ als die aus Kontrollratten isolierten und *in vitro* mit LPS behandelten KC (Abb. 16). HAFENRICHTER et al. [1994] zeigten, dass eine *in-vitro*-LPS-Behandlung (2,5 µg/ml) von KC aus *in vivo* mit LPS behandelten Ratten zu einer höheren Freisetzung des antiinflammatorischen PGE₂ als in KC aus Kontrollratten führte. Dieser Gegensatz könnte auf eine unterschiedliche Regulierung der einzelnen Prostaglandine unter Entzündungsbedingungen hinweisen. Für das antiinflammatorische PGE₂, das LPS-induziert von KC freigesetzt wird, ist beschrieben, dass es die LPS-induzierte TNF α -Freisetzung unterdrückt [KARCK et al. 1988]. In weiteren Versuchen könnte die Expression des antiinflammatorischen PGE₂ unter den gewählten Entzündungsbedingungen untersucht werden, da PGE₂ - neben IL-10 - an der Vermittlung der inhibitorischen Wirkung der *in-vivo*-LPS-Behandlung auf die TNF α -Expression beteiligt sein könnte.

5.2 Veränderte Reaktivität von Kupfferzellen auf kurzfristige LPS-Stimulation unter Entzündungsbedingungen *in vivo* und *in vitro*

In der vorliegenden Arbeit wurde eine veränderte basale Zytokinexpression unter *in vivo* und *in vitro* simulierten Entzündungsbedingungen beobachtet (vgl. 5.1). Erweiternd konnte eine veränderte Reaktivität dieser KC auf eine kurzfristige Restimulation mit LPS gezeigt werden. Die durch eine kurzfristige LPS-Gabe induzierte Bildung der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 in KC ist ebenso wie die LPS-induzierte Bildung des antiinflammatorischen IL-10 gezeigt [DECKER 1990; KNOLLE et al. 1995; THOMPSON et al. 1998]. In Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe wurde beobachtet [MÄCK et al 2001a], dass 1 ng/ml LPS die TNF α -, IL-6- und IL-1 β -mRNA-Expression innerhalb von 2 h maximal stimulierte. Die durch 1 ng/ml LPS erzielten Effekte auf die mRNA-Expression der Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 waren durch höhere LPS-Dosen noch steigerbar, 1 ng/ml LPS entspricht somit einer submaximal wirksamen LPS-Dosis. In der gleichen Arbeit induzierte 1 ng/ml LPS in einem Zeitraum von 2 h ebenfalls bereits deutlich die TNF α - und IL-6-Proteinfreisetzung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die aus „LPS-Ratten“ isolierten KC modifiziert auf einen kurzfristigen *in-vitro*-LPS-Reiz reagierten: während ein erneuter kurzfristiger LPS-Reiz *in vitro* die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6 in den KC aus „LPS-Ratten“ signifikant schwächer induzierte als in den KC aus Kontrollratten (Abb. 17; Abb. 18), wurde die LPS-induzierte Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in Folge der *in vivo* generierten Entzündung nicht vermindert (Abb. 23; Abb. 24).

Auch unter der *in vitro* simulierten Entzündung induzierte der kurzfristige LPS-Reiz die TNF α - und IL-6-Expression in den LPS-vorbehandelten KC schwächer als in den unbehandelten KC der Kontrollratte. Der Wert war jedoch nur auf Proteinebene signifikant (Abb. 20). In aus „LPS-Ratten“ isolierten KC induzierte der kurzfristige LPS-Reiz eine schwächere IL-6-mRNA-Expression (Abb. 21) und im Unterschied dazu eine signifikant stärkere IL-10-mRNA-Expression in den LPS-vorbehandelten KC als in den nicht vorbehandelten KC (Abb. 25B).

5.2.1 Einfluss einer Entzündung *in vivo* und *in vitro* auf die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Expression von TNF α , IL-6 und IL-1 β

Der kurzfristige LPS-Reiz induzierte in den KC aus „LPS-Ratten“ einen signifikant schwächeren Anstieg der TNF α - und IL-6-mRNA und -Proteinexpression, hatte aber in beiden Versuchsgruppen ähnliche Effekte auf die IL-1 β -mRNA-Expression (Abb. 17; Abb. 18). Das proinflammatorische TNF α ist neben anderen Zytokinen ein Vermittler des Endotoxinschocks [SIMPSON et al. 1997]. Mechanismen, die die TNF α -Expression begrenzen, sind daher entscheidend, damit die

Entwicklung einer Sepsis vermieden wird [DAHLE et al. 2005]. Auf der anderen Seite kann eine stark eingeschränkte Produktion der proinflammatorischen Zytokine zu einem verminderten Ansprechen der Immunzellen führen, die dann die Proliferation und spätere Dissemination des Pathogens fördert [HATAO et al. 2005]. Die KC der „LPS-Ratte“, die auf den stimulierenden LPS-Reiz *in vitro* mit einer veränderten Zytokinantwort reagierten, zeigten das Phänomen der „Endotoxintoleranz“. Andere Begriffe wie „Desensibilisierung“, „Deaktivierung“, „Adaptation“ oder auch durch „inflammatorische Stimuli induzierte Anergie“ werden in der Literatur verwendet [CAVAILLON 1995]. Der Ausdruck „Endotoxintoleranz“ beschreibt, dass nach repetitiver LPS-Applikation eine abgeschwächte LPS-induzierte Immunantwort beobachtet werden konnte. LPS-induzierte metabolische Veränderungen, die sich als Fieber, Entzündung oder Gewichtsverlust äußern, werden abgemildert, ein möglicher letaler Ausgang wird verhindert [CAVAILLON 1995]. Der Schutz ist assoziiert mit einer abgeschwächten LPS-induzierten Zytokinantwort [ERROI et al. 1993; LEHNER et al. 2001], die durch eine verminderte Ansprechbarkeit der Makrophagen auf LPS bedingt ist [FAHMI and CHABY 1993].

In der vorliegenden Arbeit induzierte ein kurzfristiger LPS-Reiz (1 ng/ml) in KC aus „LPS-Ratten“ eine signifikant geringere TNF α -Proteinfreisetzung als in KC aus Kontrollratten (Abb. 18). Die bei HAFENRICHTER et al. [1994] gezeigte abgeschwächte TNF α -Proteinproduktion von *in vivo* mit LPS behandelten Ratten wurde hier bestätigt. Allerdings injizierten HAFENRICHTER et al. [1994] *in vivo* 5 mg/kg i.p. und stimulierten die KC *in vitro* mit einer hohen Dosis von 2,5 μ g/ml, die weit über den physiologisch [ARAI et al. 1998; PILLAY et al. 1997] aber auch pathophysiologisch [JIANG et al. 1995; OPAL et al. 1999] im Pfortaderblut nachweisbaren LPS-Konzentrationen im pg/ml bzw. ng/ml-Bereich liegt. In der vorliegenden Arbeit wurde mit LPS in einer Konzentration von 1 ng/ml stimuliert und damit eine abgeschwächte TNF α -Proteinsynthese der „LPS-Ratte“ auch unter pathophysiologisch relevanten LPS-Konzentrationen gezeigt. Während HAFENRICHTER et al. [1994] die Zytokinexpression nur auf der Proteinebene untersuchten, zeigt die vorliegende Arbeit, dass die abgeschwächte TNF α -Proteinexpression mit einer geringeren Expression auch auf der mRNA-Ebene korrespondiert (Abb. 17). Die LPS-induzierte TNF α -mRNA-Expression in der „LPS-Ratte“ war geringer als in der Kontrollratte, aber der Effekt war weiterhin signifikant in Bezug zur jeweiligen Kontrolle. Übereinstimmend mit den eigenen Ergebnissen wurde der Einfluß einer wiederholten LPS-Applikation für Peritonealmakrophagen der Maus auch auf der Transkriptionsebene gezeigt: ZUCKERMAN and EVANS zeigten [1992], dass eine zweite i.v.-LPS-Gabe *in vivo* weder das TNF α -Protein im Serum noch die mRNA-Expression in aus diesen Tieren isolierten Peritonealmakrophagen induzierte und beschrieben eine im Vergleich zum ersten LPS-Stimulus auf 10 – 15% abgeschwächte TNF α -mRNA-Expression [ZUCKERMAN et al. 1991]. Auch FLOHE et al. fanden [1999] mittels semiquantitativer PCR eine graduell schwächere LPS-

induzierte TNF α -mRNA-Expression in der Leber von „endotoxin-toleranten“ Ratten“ als in der Leber von Kontrolltieren.

Ein kurzfristiger LPS-Reiz (1 ng/ml) induzierte auch die IL-6-mRNA und das IL-6-Protein in den KC aus „LPS-Ratten“ signifikant geringer als in den KC aus Kontrollratten (Abb. 17; Abb. 18). Für die „LPS-Ratte“ lagen die nach 2 h im Überstand gemessenen Werte für das IL-6-Protein unter den in den Kontrollen freigesetzten Mengen, d.h. es fand eine - wenn auch geringfügige - Inhibition durch LPS statt (Abb. 18). Für die LPS-induzierte IL-6-Expression nach vorausgegangenen LPS-Stimuli finden sich in der Literatur kontroverse Ergebnisse. So wurde für kultivierte humane Blutmonozyten von Sepsispatienten eine dramatische Abschwächung der durch LPS *in vitro* induzierten IL-6-Produktion im Vergleich zu Monozyten von gesunden Probanden gezeigt [MUNOZ et al. 1991]. Auch periphere Blutmonozyten gesunder Probanden, die LPS i.v. erhalten hatten, reagierten auf einen LPS-Stimulus *in vitro* mit einer deutlich abgeschwächten IL-6-Proteinproduktion [GRANOWITZ et al. 1993]. An Mäusen, die *in vivo* repetitiv LPS erhielten, wurde eine geringere LPS-induzierte IL-6-Proteinproduktion im Serum beobachtet [MENGOZZI et al. 1991]. Für Peritonealmakrophagen von i.p. mit LPS behandelten Ratten ist eine verminderte LPS-induzierte *in-vitro*-IL-6-Synthese im Gegensatz zur Synthese in Peritonealmakrophagen von Kontrolltieren gezeigt [ZINGARELLI et al. 1995]. HATAO et al. [2005] beschrieben - 4 h nach einer eigentlich tödlichen Dosis von 25 mg/Ratte (i.p.) - tendenziell geringere IL-6-Proteinwerte im Plasma von mit einer geringen LPS-Dosis (i.p.) vorbehandelten Ratten im Vergleich zu Plasmawerten von Kontrolltieren. Die beschriebenen Ergebnisse korrelieren mit der eigenen Beobachtung, dass die *in-vitro*-LPS-Restimulation in KC aus „LPS-Ratten“ eine geringere IL-6-Expression induzierte als in KC aus Kontrollratten (Abb. 17; Abb. 18). Im Gegensatz dazu zeigten HAFENRICHTER et al. [1994], dass ein erneuter LPS-Reiz *in vitro* in KC von *in vivo* mit LPS behandelten Ratten das IL-6 Protein signifikant stärker stimulierte als in KC von Kontrollratten. Wie beschrieben stimulierten HAFENRICHTER et al. [1994] im Gegensatz zur eigenen Arbeit mit einer sehr hohen *in-vitro*-LPS-Dosis von 2,5 μ g/ml. Eine weitere Erklärung könnte im unterschiedlichen Zeitpunkt der Proteinuntersuchung liegen. Während HAFENRICHTER et al. [1994] das Maximum der LPS-induzierten IL-6-Synthese bei 48 h fanden und die in diesem Zeitraum produzierte IL-6-Proteinmenge verglichen, wurde in der eigenen Arbeit die produzierte IL-6-Menge bereits 2 h nach dem kurzfristigen LPS-Reiz bestimmt, da Vorarbeiten der Arbeitsgruppe eine deutliche LPS(1 ng/ml)-induzierte IL-6-Proteinsynthese bereits nach 2 h gezeigt hatten [MÄCK 2001]. In den KC aus „LPS-Ratten“ induzierte LPS in diesem Zeitraum das IL-6-Protein nicht. Es könnte sich dabei um ein zeitlich gebundenes refraktäres Verhalten der KC aus „LPS-Ratten“ handeln. Diese Annahme wird durch ein bei MUNOZ et al. [1991] beobachtetes Phänomen unterstützt: humane Blutmonozyten von Sepsispatienten produzierten *in vitro* deutlich weniger LPS-induziertes IL-6-Protein als die Zellen von gesunden Probanden. Die LPS-induzierte Proteinproduktion der

Blutmonozyten von Sepsispatienten glich sich im weiteren zeitlichen Verlauf der Produktion der gesunden Probanden an. D.h. im zeitlichen Verlauf der Studie wurde eine „Erholung“ der Zytokinproduktion beobachtet. Ein weiterer Aspekt ist das bekannte zeitversetzte Auftreten der verschiedenen Zytokine nach LPS-Stimulation: TNF α wird rasch maximal freigesetzt und ist dann an der Regulation der anderen Zytokine beteiligt. Entsprechend hemmten monoklonale Antikörper gegen TNF α teilweise die IL-6-Freisetzung [LUSTER et al. 1994]. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte abgeschwächte TNF α -Freisetzung in KC aus „LPS-Ratten“ könnte daher zu der eingeschränkten bzw. evtl. nur verzögerten IL-6-Produktion beigetragen haben. Entsprechend den Ergebnissen für TNF α induzierte LPS in den KC aus „LPS-Ratten“ auch die IL-6-mRNA-Expression parallel zum Protein signifikant schwächer als in den KC aus Kontrollratten (Abb. 17). Auch für IL-6 wurde folglich in der vorliegenden Arbeit eine Regulation auf dem Transkriptionslevel unter Entzündungsbedingungen gezeigt. Die eigenen Beobachtungen stimmen mit Ergebnissen von FLOHE et al. [1999] überein, die mittels semiquantitativer PCR gefunden wurden: LPS induzierte in dieser Arbeit die mRNA-Expression von IL-6 in der Leber von „endotoxin-toleranten Ratten“ graduell schwächer als in der Leber von „nicht-toleranten“ Kontrolltieren. Die eigenen Ergebnisse zeigen die Regulation der IL-6-mRNA speziell für die KC, die als sessile Makrophagen als potenteste Quelle der Interleukin-6-Synthese in den hepatischen Sinusoiden während einer Entzündung anzusehen sind [BUSAM et al. 1990; HOFFMANN et al. 1994].

Im Gegensatz zur deutlich geringeren LPS-induzierten TNF α und IL-6-Expression in der „LPS-Ratte“ als in der Kontrollratte war die LPS-induzierte IL-1 β -mRNA-Expression in beiden Versuchsgruppen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 17). Die IL-1 β -mRNA wurde wie beschrieben schon in den unbehandelten KC der Kontrollratte deutlich basal exprimiert (Abb. 5), die Beurteilung der durch einen kurzfristigen LPS-Reiz-induzierten Steigerung der IL-1 β -mRNA-Expression war daher nur eingeschränkt möglich. Das IL-1 β -Protein wurde aus den in 5.1.1 angeführten Gründen nicht bestimmt. In der Literatur wurde ein hemmender Einfluss einer *in vivo* induzierten Entzündung auch auf das IL-1 β -Protein beschrieben: Mäuse, die durch repetitive i.p. LPS-Gaben über vier Tage „endotoxin-tolerant“ wurden, zeigten in Milzhomogenaten nach erneuter *in-vivo*-LPS-Gabe eine im Vergleich zu Kontrolltieren geringere, aber nicht vollständig unterdrückte IL-1 β -Proteinexpression. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde eine unterschiedlich starke Expressionshemmung der einzelnen Zytokine bei „Endotoxintoleranz“ beschrieben: TNF α und IL-6 wurden im Vergleich deutlich stärker als IL-1 α und IL-1 β gehemmt [ERROI et al. 1993]. MUNOZ et al. [1991] beobachteten neben einer verminderten TNF α - und IL-6-Freisetzung auch ein vermindertes Level an LPS-induziert freigesetztem und zellassoziertem IL-1 β -Protein in kultivierten peripheren Blutmonozyten von Sepsispatienten im Vergleich zur Expression in Monozyten von gesunden Probanden.

Auch ein möglicher Einfluss der *in vitro* durch die längerfristige LPS-Vorbehandlung simulierten Entzündung auf die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Zytokinexpression wurde untersucht. Nach der Inkubation von über 48 h kultivierten Ratten-KC mit LPS (100 ng/ml) über 24 h wurde innerhalb von 90 Minuten keine LPS-induzierte TNF α -mRNA-Expression gefunden [GREWE et al. 1994]. In Bezug auf diese Fragestellung wurde die Proteinexpression bei GREWE et al. [1994] nicht untersucht. Im Gegensatz zur fehlenden LPS-induzierten mRNA-Expression bei GREWE et al. [1994] zeigten die über 24 h mit LPS vorbehandelten KC in der eigenen Arbeit nur eine tendenziell schwächere TNF α -mRNA-Expression (Abb. 19). Auf Proteinebene wurde jedoch eine signifikant abgeschwächte LPS-induzierte TNF α -Expression in den LPS-vorbehandelten im Vergleich zu den unbehandelten KC der Kontrollratte beobachtet (Abb. 20). Der nicht nachweisbare Effekt einer signifikanten Abschwächung der TNF α -Expression auf mRNA-Ebene in der Kontrollratte kann ursächlich in der geringeren LPS-Konzentration von 1 ng/ml, die in der eigenen Arbeit zur lang- und kurzfristigen LPS-Behandlung gewählt wurde, begründet sein (Abb. 19). Im Gegensatz zu GREWE et al. [1994], die die mRNA-Expression mittels semi-quantitativer PCR untersuchten, wurde in der eigenen Arbeit die quantitative Methode mittels LC-PCR verwendet. Die über 24 h zusätzlich *in vitro* mit LPS behandelten KC aus „LPS-Ratten“ unterschieden sich bzgl. ihrer durch den kurzfristigen LPS-Reiz induzierten TNF α -Expression nicht signifikant von den nicht behandelten KC aus „LPS-Ratten“ (Abb. 21; Abb. 22), wahrscheinlich aufgrund der bereits durch die *in-vivo*-LPS-Behandlung verminderten TNF α -Expression (Abb. 17; Abb. 18).

In der Gruppe der Kontrollratte wurde die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz-induzierte IL-6-Expression von der 24-stündigen LPS-Vorbehandlung auf mRNA-Ebene nicht signifikant beeinflusst (Abb. 19), allerdings wurde von den LPS-vorbehandelten KC signifikant weniger IL-6-Protein exprimiert (Abb. 20). In den KC aus „LPS-Ratten“ induzierte der kurzfristige LPS-Reiz eine geringere IL-6-mRNA-Expression in den über 24 h zusätzlich *in vitro* mit LPS behandelten als in den unbehandelten KC der „LPS-Ratte“ (Abb. 21). Eine LPS-induzierte Freisetzung des IL-6-Proteins fand weder in den über 24 h mit LPS behandelten noch in den unbehandelten KC der „LPS-Ratte“ statt (Abb. 22). Die 24-stündige *in-vitro*-LPS-Behandlung beeinflusste weder die durch den kurzfristigen LPS-Reiz induzierte IL-1 β -mRNA-Expression in KC aus den Kontrollratten noch in den KC aus „LPS-Ratten“ (Abb. 19; Abb. 21).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Phänomen der „Endotoxintoleranz“ für die KC aus „LPS-Ratten“ sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt. Auch unter der *in vitro* simulierten Entzündung konnte sowohl für die aus „LPS-Ratten“ als auch für die aus Kontrollratten isolierten KC eine ähnliche Tendenz, d.h. eine verminderte LPS-induzierte Expression von TNF α und IL-6 - nicht aber von IL-1 β - beobachtet werden.

5.2.2 Einfluss einer Entzündung *in vivo* und *in vitro* auf die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Expression von IL-10

Die KC zeigten in der vorliegenden Arbeit das Phänomen der „Endotoxintoleranz“, ein kurzfristiger LPS-Reiz induzierte die proinflammatorischen Zytokine unter den gewählten Entzündungsbedingungen geringer als unter Normalbedingungen. IL-10 könnte als ein antiinflammatorischer Faktor an der Entwicklung einer „Endotoxintoleranz“ beteiligt sein. Ein kurzfristiger LPS-Reiz induzierte die IL-10-mRNA und das IL-10-Protein in KC aus „LPS-Ratten“ nicht schwächer als in Kontrollratten (Abb. 23; Abb. 24). Die durch den kurzfristigen LPS-Reiz induzierte Expression des antiinflammatorischen IL-10 wurde - im Gegensatz zur Expression von TNF α und IL-6 - durch die *in vivo* generierte Entzündung nicht beeinflusst. Die „Deaktivierung“ der KC bzgl. der LPS-induzierten Zytokinexpression verlief unter den gewählten Bedingungen also selektiv: die fehlende Abschwächung der LPS-induzierten IL-10-Expression in den KC der Leber unter Entzündungsbedingungen könnte die Bedeutung des antiinflammatorischen IL-10 innerhalb von Entzündungsprozessen unterstreichen. Die eigenen Untersuchungen an KC stimmen mit Beobachtungen von FLOHE et al. [1999] überein, die ebenfalls keine Unterschiede bzgl. der LPS-induzierten IL-10-mRNA-Expression von „endotoxin-toleranten“ und „nicht-toleranten“ Kontrollratten fanden. FLOHE et al. [1999] beobachteten 2 h und 5 h nach einer i.v.-LPS-Injektion eine ähnliche IL-10-mRNA-Expression im Lebergewebe von repetitiv i.p. mit LPS behandelten Ratten und Kontrollratten.

Die *in vitro* durch die längerfristige LPS-Vorbehandlung simulierte Entzündung beeinflusste in der Kontrollratte die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierte IL-10-Expression weder auf der mRNA- noch auf der Proteinebene (Abb. 25A). Für periphere Blutmonozyten des Menschen wurde gezeigt, dass eine 24-stündige *in-vitro*-Vorbehandlung mit LPS zu einer verminderten IL-10-Proteinsynthese während der darauf folgenden Kultivierung mit LPS führte. Die Abschwächung des LPS-Effektes war abhängig von der LPS-Konzentration während der Vorbehandlung, so führte eine Vorbehandlung mit höheren LPS-Konzentrationen zu einer stärkeren Abschwächung der LPS-induzierten IL-10-Proteinexpression [RANDOW et al. 1995]. Die bei RANDOW et al. [1995] beschriebenen Ergebnisse wurden an humanen Blutmonozyten beobachtet, so dass die fehlende Übereinstimmung mit der eigenen Beobachtung über Spezies- bzw. Gewebe-spezifische Unterschiede erklärt werden könnte. FLOHE et al. [1999], die 5 h nach einer LPS-Injektion *in vivo* eine abgeschwächte LPS-induzierte IL-10-mRNA-Expression in „LPS-toleranten“ Ratten nur in der Lunge, nicht aber – übereinstimmend mit der eigenen Beobachtung - in der Leber fanden, legen eine differenzierte organspezifische Expression von IL-10 in Lunge und Leber auch innerhalb eines Organismus nahe. Im Gegensatz zu den KC aus Kontrollratten beeinflusste die *in vitro* simulierte Entzündung die Reaktivität der KC aus „LPS-Ratten“ bezüglich der LPS-induzierten IL-10-Expression: der kurzfristige LPS-Reiz induzierte einen signifikant höheren Anstieg der IL-10-

mRNA-Expression in den zusätzlich über 24 h mit LPS behandelten als in den nicht behandelten KC aus „LPS-Ratten“ (Abb. 25B).

Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 könnte an der Vermittlung der „Endotoxintoleranz“ beteiligt sein. Es wurde jedoch gezeigt, dass auch IL-10-defiziente Mäuse „endotoxin-tolerant“ werden konnten [BERG et al. 1995]. Allerdings hemmt rekombinantes Maus-IL-10 in Peritonealmakrophagen der Maus sowohl die LPS-induzierte TNF α -Produktion als auch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffzwischenprodukten [BOGDAN et al. 1991]. Auch RANDOW et al. [1995] zeigten für humane Blutmonozyten, dass die abgeschwächte LPS-induzierte TNF α -Produktion nach vorheriger LPS-Behandlung durch gleichzeitig zugesetzte neutralisierende IL-10-Antikörper teilweise aufgehoben werden konnte. Es wurde daher angenommen, dass die abgeschwächte Antwort der Zellen auf eine LPS-Reexposition teilweise durch IL-10 induziert wurde. Unter *in-vitro*-Vorbehandlung der peripheren Blutmonozyten mit IL-10 wurde ein Zustand der „LPS-Toleranz“ nachgeahmt [RANDOW et al. 1995]. Eine durch IL-10 induzierte Toleranz wurde jedoch als geringer bezeichnet, IL-10 war also weniger effektiv als LPS in Bezug auf die Induktion einer „Endotoxintoleranz“ [CAVAILLON 1995]. Weiterhin wurden für LPS und IL-10 bzgl. ihrer Rolle als Induktoren der „LPS-Toleranz“ verschiedene molekulare Wege in der Vermittlung ihres „antiinflammatorischen“ Effektes postuliert. Während LPS frühe Signalereignisse beeinflusste, inhibierte IL-10 eher späte Ereignisse der Zytokinregulation [GRÜTZ 2005].

In der vorliegenden Arbeit induzierte ein kurzfristiger LPS-Reiz die IL-10-Expression in KC aus „LPS-Ratten“ und Kontrollratten - im Gegensatz zur schwächeren LPS-induzierten Expression von TNF α und IL-6 in KC aus „LPS-Ratten“ (Abb. 17; Abb. 18) - nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 23; Abb. 24). Weiterhin induzierte ein kurzfristiger LPS-Reiz die IL-10-mRNA-Expression in LPS-vorbehandelten KC signifikant stärker als in nicht vorbehandelten KC aus „LPS-Ratten“ (Abb. 25B). Basal wurde das IL-10-Protein in den KC aus „LPS-Ratten“ innerhalb der ersten 24 h signifikant stärker exprimiert als in KC aus Kontrollratten (Abb. 13). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass IL-10 unter den simulierten Entzündungsbedingungen an der Vermittlung der inhibitorischen Wirkung der LPS-Vorbehandlung auf die Expression der proinflammatorischen Zytokine beteiligt sein könnte. Ein eindeutiger Nachweis für diese Hypothese müsste durch weitere Untersuchungen mit inhibitorischen Antikörpern gegen IL-10 erbracht werden.

FAZIT

Vor dem Hintergrund der bekannten LPS-abhängigen Veränderungen in der Leber wurde die Mediatorfreisetzung von KC unter Normalbedingungen (d.h. KC aus unbehandelten Kontrollratten) mit der Freisetzung unter Entzündungsbedingungen (d.h. längerfristige LPS-Behandlung *in vivo* und *in vitro*) verglichen.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die durch eine LPS-Behandlung *in vivo* und *in vitro* simulierte Entzündung sowohl das basale Zytokinexpressionsmuster in den KC beeinflusste als auch die Reaktivität der KC auf einen kurzfristigen LPS-Reiz veränderte. Es wurde eine geringere basale Expression der proinflammatorischen Zytokine und parallel dazu eine nicht verminderte bzw. gesteigerte Expression des antiinflammatorischen IL-10 unter Entzündungsbedingungen beobachtet. Auch das proinflammatorische Prostanoid PGD₂ wurde in der „LPS-Ratte“ unter der langfristigen *in-vitro*-LPS-Behandlung geringer als in der Kontrollratte exprimiert. Unter Entzündungsbedingungen induzierte ein kurzfristiger LPS-Reiz die proinflammatorischen Zytokine in den KC schwächer als unter Normalbedingungen. Die gewählten Entzündungsbedingungen führten damit in den KC zu einem Zustand der „Endotoxintoleranz“, der weitreichende Konsequenzen für die Regulation hepatischer, möglicherweise auch extra-hepatischer Abwehrreaktionen haben könnte.

Die fein regulierte Expression der einzelnen Zytokine unter Entzündungsbedingungen verdeutlicht ihre wichtige Rolle in Abwehrreaktionen, die mit dem Ziel ausgelöst werden, die Homöostase des Organismus wiederherzustellen. Die Beobachtung, dass die Zytokine von den Entzündungsbedingungen unterschiedlich beeinflusst wurden, könnte unterstreichen, dass die einzelnen Zytokine Teil eines Netzwerkes sind und sich gegenseitig unterstützen und regulieren. Die abgeschwächte Expression speziell von TNF α betont auch die notwendige Begrenzung der Zytokinexpression unter Entzündungsbedingungen, damit eine unkontrollierte und schädigende Entzündungsreaktion sowohl lokal in der Leber als auch systemisch im Organismus verhindert werden kann.

6. Zusammenfassung

Eine zentrale Funktion der Leber ist ihre Beteiligung an der Immunabwehr, die durch komplexe Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Leberzellen realisiert wird. Während lokaler und systemischer Entzündungsreaktionen ist die Leber ein primäres Zielorgan für bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), die unter pathologischen Bedingungen vermehrt in das mesenterial-portale Flussbett gelangen. LPS spielen als Entzündungsinduktoren - allein oder kooperativ zum Beispiel mit Anaphylatoxinen [MÄCK et al. 2001a] - eine initiale Rolle in der Regulation von hepatischen Abwehrreaktionen. Die sessilen Makrophagen der Leber – die KC – sind direkt durch LPS stimulierbar und setzen nach ihrer Aktivierung ein breites Spektrum löslicher Mediatoren wie Zytokine, Prostanoiden und reaktive Sauerstoffspezies frei [DECKER 1990]. Die von den KC produzierten proinflammatorischen Zytokine wie TNF α , IL-1 β und IL-6, das antiinflammatorische IL-10 und das proinflammatorische Prostanoid PGD₂ sind wichtige Signalträger der interzellulären Kommunikation in der Leber. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass die Simulation von Entzündungsbedingungen durch eine LPS-*in-vivo*-Behandlung von Ratten, eine veränderte Reaktivität der verschiedenen Zelltypen der Leber zur Folge hat. In der vorliegenden Arbeit sollte vor dem Hintergrund der bekannten LPS-abhängigen Veränderungen in der Leber die Mediatorfreisetzung von KC unter Normalbedingungen (d.h. KC aus unbehandelten Kontrollratten) mit der Freisetzung unter Entzündungsbedingungen (d.h. längerfristige LPS-Behandlung *in vivo* und *in vitro*) verglichen werden.

1. Die über eine längerfristige LPS-Behandlung *in vivo* und *in vitro* simulierte Entzündung beeinflusste das basale Zytokinexpressionsmuster in KC. So exprimierten KC aus *in vivo* mit LPS behandelten Ratten („LPS-Ratten“) basal signifikant weniger TNF α -mRNA und -Protein als KC aus Kontrolltieren. Für die IL-1 β -mRNA-Expression zeigte sich eine ähnliche Tendenz. Die basale IL-6-mRNA- und Proteinexpression war - mit Ausnahme einer geringeren IL-6-Proteinexpression der „LPS-Ratte“ innerhalb der ersten 24 h der Kultivierung - in beiden Versuchsgruppen nicht unterschiedlich. Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 wurde auf mRNA- und Proteinebene in KC aus „LPS-Ratten“ und Kontrollratten basal ähnlich stark exprimiert. Innerhalb der ersten 24 h der Zellkultivierung setzten KC aus „LPS-Ratten“ signifikant mehr IL-10-Protein als KC aus Kontrollratten frei.

Sowohl für KC aus Kontroll- als auch für KC aus „LPS-Ratten“ konnte eine verminderte basale Expression nicht nur der TNF α - sondern auch der IL-1 β -mRNA unter der längerfristigen LPS-Behandlung *in vitro* beobachtet werden. Für KC aus „LPS-Ratten“ zeigte sich außerdem eine geringere basale IL-6-mRNA-Expression und IL-10-Expression in den LPS-behandelten als in den unbehandelten KC. Die abgeschwächte IL-10-Expression könnte bei einer bereits durch die

in-vivo-LPS-Behandlung erhöhten IL-10-Proteinfreisetzung auf eine autoregulatorische Inhibition von IL-10 zurückgeführt werden. Auf Proteinebene war die verminderte TNF α -Expression unter der längerfristigen LPS-*in-vitro*-Behandlung nur für KC aus Kontrolltieren nachweisbar. Unter einer längerfristigen LPS-Behandlung *in vitro* konnte auch eine geringere Expression des proinflammatorischen Prostanoids PGD₂ in KC aus „LPS-Ratten“ als in KC aus Kontrollratten beobachtet werden.

2. Im zweiten Teil der Arbeit wurde der mögliche Einfluss der simulierten Entzündungsbedingungen (vgl. 1.) auf die durch einen kurzfristigen LPS-Reiz induzierten Effekte untersucht. Die aus „LPS-Ratten“ isolierten KC reagierten modifiziert auf einen kurzfristigen LPS-Reiz *in vitro*: während ein erneuter kurzfristiger LPS-Reiz *in vitro* die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6 in den KC aus „LPS-Ratten“ signifikant schwächer als in den KC aus Kontrollratten induzierte, wurde die LPS-induzierte Expression des antiinflammatorischen IL-10 in Folge der *in vivo* generierten Entzündung nicht vermindert. Auch die LPS-induzierte IL-1 β -mRNA-Expression war in KC aus Kontrollratten und „LPS-Ratten“ nicht signifikant unterschiedlich. Unter der *in vitro* simulierten Entzündung zeigte sich sowohl für die aus „LPS-Ratten“ als auch für die aus Kontrollratten isolierten KC eine ähnliche Tendenz, d.h. eine verminderte LPS-induzierte Expression von TNF α und IL-6 - nicht aber von IL-1 β und IL-10; die Werte waren allerdings nur teilweise signifikant. Der kurzfristige LPS-Reiz induzierte weiterhin in den zusätzlich *in vitro* mit LPS behandelten KC aus „LPS-Ratten“ eine signifikant stärkere IL-10-mRNA-Expression als in den nicht vorbehandelten KC aus „LPS-Ratten“.

Eine „Deaktivierung“ oder „Endotoxintoleranz“ von Makrophagen und Monozyten nach repetitiven LPS-Reizen ist beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen im Gegensatz zu anderen Untersuchungen mit LPS in einer pathophysiologisch relevanten Konzentration von 1 ng/ml behandelt und die Ergebnisse für die KC der Leber sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen. Die gewählten Entzündungsbedingungen führten zu einem Zustand der „Endotoxintoleranz“ der KC, der weitreichende Konsequenzen für die Regulation hepatischer, möglicherweise auch extrahepatischer Abwehrreaktionen haben könnte. Das Augenmerk der jeweiligen Untersuchungen zur „Endotoxintoleranz“ richtete sich vor allem auf eine abgeschwächte LPS-induzierte Zytokinantwort von Zellen, die vorher langfristig mit LPS behandelt wurden. Erweiternd zeigten die eigenen Ergebnisse eine veränderte Zytokinexpression der *in vivo* mit LPS behandelten Ratten, die sich bereits vom basalen Expressionsmuster einer Kontrollratte unterschied. Weiterhin konnte eine verminderte basale Expression proinflammatorischer Zytokine auch unter einer langfristigen LPS-Behandlung *in vitro* sowohl für KC aus „LPS-Ratten“ als auch für KC aus Kontrollratten beobachtet werden.

Die fein regulierte Expression der einzelnen Zytokine unter Entzündungsbedingungen verdeutlicht ihre wichtige Rolle in Abwehrreaktionen, die mit dem Ziel ausgelöst werden, die Homöostase des Organismus wiederherzustellen. Die Beobachtung, dass die Zytokine von den Entzündungsbedingungen unterschiedlich beeinflusst wurden, könnte unterstreichen, dass die einzelnen Zytokine Teil eines Netzwerkes sind und sich gegenseitig unterstützen und regulieren. Die Ergebnisse bezüglich der IL-10-Expression in der vorliegenden Arbeit stützen die Hypothese, dass IL-10 an der Vermittlung der inhibitorischen Wirkung einer LPS-Vorbehandlung auf die Expression der proinflammatorischen Zytokine beteiligt sein könnte. Ein eindeutiger Nachweis für diese Hypothese müsste durch weitere Untersuchungen mit inhibitorischen Antikörpern gegen IL-10 erbracht werden. Die abgeschwächte Expression speziell von TNF α betont auch die notwendige Begrenzung der Zytokinexpression unter Entzündungsbedingungen, damit eine unkontrollierte und schädigende Entzündungsreaktion sowohl lokal in der Leber als auch systemisch im Organismus verhindert werden kann.

LITERATURVERZEICHNIS

ALEXANDER C, RIETSCHER ET (1999):

Bakterielle Lipopolysaccharide - Hochaktive Stimulatoren der angeborenen Immunität.
Biospektrum 4: 275-281

ANTHONY R, MORRISON L, MACSWEEN RN, WHALEY K (1985):

Biosynthesis of complement components by cultured rat hepatocytes. *Biochem J* 232:
93-98

ARAI M, MOCHIDA S, OHNO A, ARAI S, FUJIWARA K (1998)

Selective bowel decontamination of recipients for prevention against liver injury
following orthotopic liver transplantation: evaluation with rat models. *Hepatology*
27:123-127

ARMBRUST T, SCHMITT E, RAMADORI G (1995):

Viable rat Kupffer cells synthesize but do not secrete interleukin-1: indications for
necrosis-induced maturation of interleukin-1 alpha, but not of interleukin-1 beta
Biochem Biophys Res Commun 207: 637-645

AYALA A, PERRIN MM, WANG P, CHAUDRY IH (1992):

Sepsis induces an early increased spontaneous release of hepatocellular stimulatory
factor (interleukin-6) by Kupffer cells in both endotoxin tolerant and intolerant mice. *J*
Surg Res 52: 635-641

BELLEZZO JM, BRITTON RS, BACON BR, FOX ES (1996):

LPS-mediated NF-kappa beta activation in rat Kupffer cells can be induced
independently of CD14. *Am J Physiol* 270: G956-961

BERG DJ, KUHN R, RAJEWSKY K, MULLER W, MENON S, DAVIDSON N, GRUNIG G,
RENNICK D (1995):

Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of
endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J Clin*
Invest 96: 2339-2347

BHATNAGAR R, SCHIRMER R, ERNST M, DECKER K (1981):

Superoxide release by zymosan-stimulated rat Kupffer cells *in vitro*. *Eur J Biochem*
119: 171-175

BIRMELIN M, KARCK U, DIETER P, FREUDENBERG N, DECKER K:

Distribution of endotoxin and endotoxin-stimulated prostanoid production in primary cultures of rat Kupffer cells. In: Cells of the hepatic sinusoid (Kirn A, Knook DL, Wisse W, eds) Vol. 1: Kupffer Cell Foundation, Rijswijk 1986, 295-300

BOGDAN C, VODOVOTZ Y, NATHAN C (1991):

Macrophage deactivation by interleukin 10. J Exp Med 174:1549-1555

BOUWENS L, DE BLESER P, VANDERKERKEN K, GEERTS B, WISSE E (1992):

Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. Enzyme 46: 155-168

BRADHAM CA, PLUMPE J, MANNS MP, BRENNER DA, TRAUTWEIN C (1998):

Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. Am J Physiol 275: G387-392

BROCK TD, MADIGAN MT, MARTINKO JM, PARKER J:

Biology of microorganisms (seventh edition), Prentice Hall International Editions, New Jersey 1994

BROWER A, BARELDS RJ, KNOOK DL:

Centrifugal separation of mammalian cells. Rickwood D (ed.); In: Centrifugation: a practical approach: Oxford University Press, USA 1984, 183-218

BURT AD, PATH MRC, LE BAIL B, BALABAUD C, BIOULAC-SAGE P (1993):

Morphological investigation of sinusoidal cells. Semin Liver Dis 13: 21-38

BUSAM KJ, BAUER TM, BAUER J, GEROK W, DECKER K (1990):

Interleukin-6 release by rat liver macrophages. J Hepatol 11: 367-373

CASTELEIJN E, KUIPER J, VAN ROOIJ HC, KAMPS JA, KOSTER JF, VAN BERKEL TJ (1988):

Endotoxin stimulates glycogenolysis in the liver by means of intercellular communication. J Biol Chem 263: 6953-6955

CASTELL JV, GOMEZ-LECHON MJ, DAVID M, ANDUS T, GEIGER T, TRULLENQUE R, FABRA R, HEINRICH PC (1989):

Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. FEBS Lett 242: 237-239

CAVAILLON JM (1995):

The nonspecific nature of endotoxin tolerance. Trends Microbiol 3: 320-324

CERETTI DP, KOZLOSZY CJ, MOSLEY B, NELSON N, VAN NESS K, GREENSTREET TA, MARCH CJ, KRONHEIM SR, DRUCK T, CANNIZZARO-LA (1992):

Molecular cloning of the Interleukin-1 β converting enzyme. *Science* 256: 97-100

CHOW JC, YOUNG DW, GOLENBOCK DT, CHRIST WJ, GUSOVSKY F (1999):

Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 274: 10689-10692

DAHLE MK, MYHRE AE, AASEN AO, WANG JE (2005):

Effects of forskolin on Kupffer cell production of interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha differ from those of endogenous adenylyl cyclase activators: possible role for adenylyl cyclase 9. *Infect Immun* 73: 7290-7296

DECKER K (1985):

Eicosanoids, signal molecules of liver cells. *Semin Liver Dis* 5:175-190

DECKER K (1990):

Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 192: 245-261

DE WAAL MALEFYT R, ABRAMS J, BENNETT B, FIGDOR CG, DE VRIES JE (1991):

Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174: 1209-1220

ERROI A, FANTUZZI G, MENGOZZI M, SIRONI M, ORENCOLE SF, CLARK BD, DINARELLO CA, ISETTA A, GNOCCI P, GIOVARELLI M, et al (1993):

Differential regulation of cytokine production in lipopolysaccharide tolerance in mice. *Infect Immun* 61: 4356-4359

ESSANI A, MC GUIRE GM, MANNING AM, JAESCHKE H (1995):

Differential induction of mRNA for ICAM-1 and selectins in hepatocytes, Kupffer cells and endothelial cells during endotoxemia. *Biochem Biophys Res Comm* 211: 74-82

EYHORN S, SCHLAYER HJ, HENNINGER HP, DIETER P, HERMANN R, WOORT-MENKER M, BECKER H, SCHAEFER HE, DECKER K (1988):

Rat hepatic sinusoidal cells in monolayer culture. Biochemical and ultrastructural characteristics. *J Hepatol* 6: 23-35

FAHMI H, CHABY R (1993):

Selective refractoriness of macrophages to endotoxin-induced production of tumor necrosis factor, elicited by an autocrine mechanism. *J Leukoc Biol* 53: 45-52

- FENNEKOHL A, SCHIEFERDECKER HL, JUNGERMANN K, PÜSCHEL GP (1999):
Differential expression of prostanoid receptors in hepatocytes, Kupffer cells, sinusoidal endothelial cells and stellate cells of rat liver. *J Hepatol* 30: 38-47
- FENTON MJ, GOLENBOCK DT (1998):
LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol* 64: 25-32
- FLOHE S, DOMINGUEZ FERNANDEZ E, ACKERMANN M, HIRSCH T, BORGERMANN J, SCHADE FU (1999):
Endotoxin tolerance in rats: expression of TNF-alpha, IL-6, IL-10, VCAM-1 AND HSP 70 in lung and liver during endotoxin shock. *Zytokine* 11: 796-804
- GARDINER KR, ANDERSON NH, ROWLANDS BJ, BARBUL A (1995):
Colitis and colonic mucosal barrier dysfunction. *Gut* 37: 530-535
- GRANOWITZ EV, PORAT R, MIER JW, ORENCOLE SF, KAPLANSKI G, LYNCH EA, YE K, VANNIER E, WOLFF SM, DINARELLO CA (1993):
Intravenous endotoxin suppresses the cytokine response of peripheral blood mononuclear cells of healthy humans. *J Immunol* 151: 1637-1645
- GREWE M, GAUSLING R, GYUFKO K, HOFFMANN R, DECKER K (1994):
Regulation of the mRNA expression for tumor necrosis factor-alpha in rat liver macrophages. *J Hepatol* 20: 811-818.
- GRÜTZ G (2005):
New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 77: 3-15
- HAFENRICHTER DG, ROLAND CR, MANGINO MJ, FLYE MW (1994):
The Kupffer cell in endotoxin tolerance: mechanisms of protection against lethal endotoxemia. *Shock* 2: 251-256
- HATAO F, HIKI N, MIMURA Y, OGAWA T, KOJIMA J, MAFUNE K, HAWKINS LD, MUROI M, TANAMOTO K, KAMINISHI M (2005):
The induction of super-resistance using synthetic lipopolysaccharide receptor agonist rescues fatal endotoxemia in rats without excessive immunosuppression. *Shock* 23: 365-370
- HAZIOT A, CHEN F, FERRERO F, LOW MG, SILBER R AND GOYERT SM (1998):
The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidyl-inositol linkage. *J Immunol* 141: 547-552

HEINRICH PC, CASTELL JV, ANDUS T (1990):

Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265: 621-636

HOFFMANN R, HENNINGER HP, SCHULZE-SPECKING A, DECKER K (1994):

Regulation of interleukin-6 receptor expression in rat Kupffer cells: modulation by cytokines, dexamethasone and prostaglandin E2. *J Hepatol* 21: 543-50

HURLEY JC (1995):

Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin Microbiol Rev* 8: 268-292

IKEJIMA K, ENOMOTO N, SEABRA V, IKEJIMA A, BRENNER DA, THURMAN RG (1999):

Pronase destroys the lipopolysaccharide receptor CD14 on Kupffer cells. *Am J Physiol* 276: G591-598

JIANG J, BAHRAMI S, LEICHTFRIED G, REDL H, OHLINGER W, SCHLAG G (1995):

Kinetics of endotoxin and tumor necrosis factor appearance in portal and systemic circulation after hemorrhagic shock in rats. *Ann Surg* 221: 100-106

JUNGERMANN K, KATZ N (1989):

Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol Rev* 69: 708-764

JUNGERMANN K, KIETZMANN T (1996):

Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr* 16: 179-203

KARCK U, PETERS T, DECKER K (1988):

The release of tumor necrosis factor from endotoxin-stimulated rat Kupffer cells is regulated by prostaglandin E2 and dexamethasone. *J Hepatol* 7: 352-361

KMIEC Z (2001):

Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 161: III-XIII, 1-151

KNOLLE P, SCHLAAK J, UHRIG A, KEMPF P, MEYER ZUM BÜSCHENFELDE KH, GERKEN G (1995):

Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol* 22: 226-229

KNOLLE P, UHRIG A, PROTZER U, TRIPPLER M, DUCHMANN R, MEYER ZUM BÜSCHENFELDE KH, GERKEN G (1998):

Interleukin-10 expression is autoregulated at the transcriptional level in human and murine Kupffer cells. *Hepatology* 27: 93-99

KOLEVA M, SCHLAF G, LANDMANN R, GOTZE O, JUNGERMANN K, SCHIEFERDECKER HL (2002):

Induction of anaphylatoxin C5a receptors in rat hepatocytes by lipopolysaccharide *in vivo*: mediation by interleukin-6 from Kupffer cells. *Gastroenterology* 122: 697-708

KUIPER J, ZIJLSTRA FJ, KAMPS JA, VAN BERKEL TJ (1988):

Identification of prostaglandin D₂ as the major eicosanoid from liver endothelial and Kupffer cells. *Biochim Biophys Acta* 959: 143-152

LEHNER MD, ITTNER J, BUNDSCHUH DS, VAN ROOIJEN N, WENDEL A, HARTUNG T (2001):

Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection despite attenuated cytokine response. *Infect Immun* 69: 463-471

LÖFFLER G UND PETRIDES PE:

Biochemie und Pathobiochemie. (6., korrigierte Auflage), Springer Verlag, Berlin 1998

LUMSDEN AB, HENDERSON JM, KUTNER MH (1988):

Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology* 8: 232-236

LUSTER MI, GERMOLEC DR, YOSHIDA T, KAYAMA F, THOMPSON M (1994)

Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver. *Hepatology* 19: 480-488.

MAC PHEE PJ, SCHMIDT EE, GROOM AC:

Organization and flow in the liver microcirculation. In: Messmer K, Menger MD, ed. *liver microcirculation and hepatobiliary function*. Karger, Basel 1993, 52-73

MÄCK C (2001):

Interzelluläre Signaltransduktion durch Cytokine in der Leber. Induktion von Akut-Phase-Proteinen in Hepatocyten und Adhäsionsmolekülen in Sinusoidalen Endothelzellen durch Anaphylatoxin C5a- und LPS-abhängige Cytokin-Freisetzung aus Kupfferzellen. *Mathematisch-naturwissenschaftliche Diss. Göttingen* 2001

MÄCK C, JUNGERMANN K, GÖTZE O, SCHIEFERDECKER HL (2001a):

Anaphylatoxin actions in rat liver: synergistic enhancement by C5a of lipopolysaccharide-dependent α 2-Macroglobulin gene expression in hepatocytes via IL-6 release from Kupffer Cells. *J Immunol* 167: 3972-3979

MÄCK C, SCHIEFERDECKER HL, JUNGERMANN K:

Activation of the gene for the type-1 acute phase protein hemopexin in hepatocytes by Kupffer cell-derived IL-6 but not IL-1 β following stimulation with C5a or LPS: Lack of post-translational processing of IL-1 β . In: *Cells of the Hepatic Sinusoid* (Wisse E, Knook D, Arthur MJP, eds) Vol. 8: Kupffer Cell Foundation, Leiden 2001b, 28-29

MARLETTA MA, YOON PS, IYENGAR R, LEAF CD, WISHNOK JS (1988):

Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27: 8706-8711

MCNAB GL, AFFORD SC, MORLAND CM, STRAIN AJ, GOERDT S, JOPLIN R, ADAMS DH:

Cultured human hepatic sinusoidal endothelial cells express and secrete adhesion molecules and chemokines that are important for leukocyte recruitment to the liver. In: *Cells of the hepatic sinusoid* (Wisse E, Knook DL, Balabaud C, eds) Vol. 6: Kupffer Cell Foundation, Bordeaux 1997, 123-126

MENGOZZI M, SIRONI M, GADINA M, GHEZZI P (1991):

Reversal of defective IL-6 production in lipopolysaccharide-tolerant mice by phorbol myristate acetate. *J Immunol* 147: 899-902

MUNOZ C, CARLET J, FITTING C, MISSET B, BLERLOT JP, CAVAILLON JM (1991):

Dysregulation of *in vitro* cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 88: 1747-1754

OPAL SM, SCANNON PJ, VINCENT JL, WHITE M, CARROLL SF, PALARDY JE, PAREJO NA, PRIBBLE JP, LEMKE JH (1999):

Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 180:1584-1589

PILLAY SP, WYNTER C, LYNCH S, WALL D, BALDERSON G, STRONG R (1997):

Endotoxin levels in donors and recipients during orthotopic liver transplantation. *Aust N Z J Surg* 67: 187-191

PRAANING-VAN DALEN DP, BROUWER A, KNOOK DL (1981):

Clearance capacity of rat liver Kupffer, Endothelial, and parenchymal cells. *Gastroenterology* 81: 1036-1044

RAMADORI G, RASOKAT H, BURGER R, MEYER ZUM BUSCHENFELDE KH, BITTERSUERMANN D (1984):

Quantitative determination of complement components produced by purified hepatocytes. Clin Exp Immunol. 55: 189-196

RANDOW F, SYRBE U, MEISEL C, KRAUSCH D, ZUCKERMANN H, PLATZER C, VOLK HD (1995):

Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. J Exp Med 181: 1887-1892

ROITT IM, BROSTOFF J, MALE DK:

IMMUNOLOGY. (fourth edition) Mosby, Times Mirror International Publishers Limited, London 1996

SASSE D, SPORNITZ UM, MALY IP (1992):

Liver architecture. Enzyme 46: 8-32

SCOAZEC JY, FELDMANN G (1994):

The cell adhesion molecules of hepatic sinusoidal endothelial cells. J Hepatol 20: 296-300

SEATTER SC, LI MH, BUBRICK MP, WEST MA (1995):

Endotoxin pretreatment of human monocytes alters subsequent endotoxin-triggered release of inflammatory mediators. Shock 3: 252-258

SIMPSON KJ, LUKACS NW, COLLETTI L, STRIETER RM, KUNKEL SL (1997):

Cytokines and the liver. J Hepatol 27: 1120-1132

SINGER II, SCOTT S, HALL GL, LIMJUCO G, CHIN J, SCHMIDT JA (1988):

Interleukin 1 β is localized in the cytoplasmic ground substance but is largely absent from the Golgi apparatus and plasma membranes of stimulated human monocytes. J Exp Med 167: 389-397

SPRINGER TA (1990):

Adhesion receptors of the immune system. Nature 346: 425-434

SU GL, FREESWICK PD, GELLER DA, WANG Q, SHAPIRO RA, WAN Y-H, BILLIAR TR, TWEARDY DJ, SIMMONS RL, AND WANG SC (1994):

Molecular cloning, characterization and tissue distribution of rat lipopolysaccharide binding protein. J Immunol 153: 743-752

THOMPSON K, MALTBY J, FALLOWFIELD J, MCAULAY M, MILLWARD-SADLER H, SHERON N (1998):

Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 28: 1597-1606

TOMITA M, YAMAMOTO K, KOBASHI H, OHMOTO M, TSUJI T (1994):

Immunohistochemical phenotyping of liver macrophages in normal and diseased human liver. *Hepatology* 20: 317-325

ULEVITCH RJ, TOBIAS PS (1995):

Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 13: 437-457

VALATAS V, KOLIOS G, MANOUSOU P, XIDAKIS C, NOTAS G, LJUMOVIC D, KOUROUMALIS EA (2004):

Secretion of inflammatory mediators by isolated rat Kupffer cells: the effect of octreotide. *Regul Pept* 120: 215-225

WILLEMS F, MARCHANT A, DELVILLE JP, GERARD C, DELVAUX A, VELU T, DE BOER M, GOLDMAN M (1994):

Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol* 24: 1007-1009

ZINGARELLI B, CHEN H, CAPUTI AP, HALUSHKA PV, COOK JA (1995):

Reorientation of macrophage mediator production in endotoxin tolerance. *Prog Clin Biol Res* 392: 529-537

ZUCKERMAN SH, EVANS GF (1992):

Endotoxin tolerance: *in vivo* regulation of tumor necrosis factor and interleukin-1 synthesis is at the transcriptional level. *Cell Immunol* 140: 513-519

ZUCKERMAN SH, EVANS GF, BUTLER LD (1991):

Endotoxin tolerance: independent regulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression. *Infect Immun* 59: 2774-2280

Danksagung

Frau PD. Dr. rer. nat. H. Schieferdecker danke ich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und für die Bereitstellung des Themas sowie für hilfreiche Korrekturen.

Frau Annegret Nath und Frau Christiane Spillner danke ich für die Einführung in die Labormethoden und die Unterstützung im Laboralltag.

Frau Prof. Dr. rer. nat. I. Probst danke ich für Ihre spontane Hilfe.

Meiner Mitdoktorandin Lena Angrick danke ich herzlich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Unterstützung und für den kontinuierlichen inhaltlichen Austausch.

Die Arbeitsgruppe in der Abteilung Biochemie I im Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Sonderforschungsbereich (SFB „Projektbereich B“) gefördert.

Mein besonderer Dank gilt meinem Bruder Karsten und meinen Eltern für Ihre Unterstützung.