

***De novo* Induktion von Anaphylatoxin C5a-Rezeptoren in Hepatocyten
der Ratte durch den Entzündungsauslöser Lipopolysaccharid *in vivo*
Vermittlung durch die Entzündungsmediatoren Interleukin-6 und -1β**

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

vorgelegt von
Milena Koleva
aus Dobrich, Bulgarien

Göttingen 2001

D7

Referent: Prof. Dr. Kurt Jungermann

Korreferent: Prof. Dr. Rüdiger Hardeland

Tag der mündlichen Prüfung: 3.05.2001

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1. EINLEITUNG.....	3
1.1 Aufgaben der Leber.....	3
1.2 Aufbau der Leber.....	3
1.3 Entzündungs-Auslöser und -Mediatoren in der Leber und deren Re-	
zeptoren.....	5
1.3.1 Anaphylatoxin C5a und C5a-Rezeptoren (C5aR) [CD88].....	5
1.3.2 Bakteriellcs Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin) und LPS-Rezeptoren.....	9
1.3.3 Proinflammatorische Cytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 und deren Rezeptoren.....	10
1.4 Aufgabenstellung.....	13
2. MATERIALIEN.....	14
2.1 Tiere und Tierhaltung.....	14
2.2 Geräte.....	14
2.3 Chemikalien und Biochemikalien.....	15
2.4 Verbrauchsmaterialien.....	17
2.5 Reinigungs- und Nachweissysteme (Kits).....	17
2.6 Enzyme.....	18
2.7 Oligonukleotide.....	18
2.8 Antikörper.....	18
3. METHODEN.....	19
3.1 Tierexperimentelle Methoden: <i>in vivo</i> Modelle.....	19
3.2 Isolierte Leberperfusion.....	19
3.3 Zellbiologische Methoden.....	22
3.3.1 Isolierung von Hepatocyten	22
3.3.2 Versuche mit frisch isolierten Hepatocyten.....	24
3.3.3 Primärkultur von Rattenhepatocyten.....	25
3.3.4 Versuche mit kultivierten Hepatocyten.....	26

3.4	Molekularbiologische Methoden.....	28
3.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus frischen und kultivierten Hepatocyten.....	28
3.4.2	Reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	30
3.4.3	Trennung und Visualisierung der RT-PCR-Produkte (Gelelektrophorese).....	34
3.4.4	Sequenzierung der RT-PCR-Produkte.....	36
3.5	Biochemische Methoden.....	39
3.5.1	Enzymatische Bestimmung der Glykogen-Phosphorylase a - Aktivität.....	39
3.5.2	Enzymatische Bestimmung von Glucose.....	43
3.6	Immunbiochemische Methoden.....	44
3.6.1	Vorbereitung von kultivierten Hepatocyten für FACS-Analyse und Immuncytochemie.....	44
3.6.2	Durchflußcytometrie im <u>F</u> luorescence- <u>a</u> ktiviertem <u>C</u> ell- <u>S</u> orter (FACS).....	45
3.6.3	Immunocytochemie.....	47
3.7	Statistische Auswertungen.....	48
4.	ERGEBNISSE.....	49
4.1	Isolierung von Hepatocyten mit intakten Oberflächenstrukturen.....	49
4.2	Induktion funktioneller C5a-Rezeptoren in Hepatocyten <i>in vivo</i> bei experimentell durch LPS induzierten Entzündungen.....	49
4.2.1	Induktion experimenteller Entzündungen in Ratten durch <i>i.p.</i> Injektion von LPS.....	49
4.2.2	C5aR-mRNA Expression in frisch isolierten Hepatocyten aus LPS-behandelten Ratten.....	51
4.2.3	C5aR-Protein-Expression in frisch isolierten Hepatocyten aus LPS-behandelten Ratten.....	51
4.2.4	Direkte Prostanoid-unabhängige Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase durch rrC5a in frisch isolierten Hepatocyten aus LPS-behandelten Ratten.....	54
4.2.5	Direkte Prostanoid-unabhängige Glucose-Freisetzung durch rrC5a in perfundierten Lebern LPS-behandelter Ratten.....	55
4.3	Induktion funktioneller C5a-Rezeptoren in Hepatocyten <i>in vivo</i> bei experimentell durch IL-6 induzierten Entzündungen.....	56
4.3.1	Induktion experimenteller Entzündungen in Ratten durch <i>i.p.</i> Injektion von IL-6.....	57
4.3.2	C5aR-mRNA Expression in frisch isolierten Hepatocyten aus IL-6-behandelten Ratten.....	57

4.3.3	C5aR-Protein-Expression in frisch isolierten Hepatocyten aus IL-6-behandelten Ratten.....	59
4.3.4	Direkte Prostanoid-unabhängige Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase durch rrC5a in frisch isolierten Hepatocyten aus IL-6-behandelten Ratten.....	61
4.3.5	Direkte Prostanoid-unabhängige Glucose-Freisetzung durch rrC5a in perfundierten Lebern IL-6-behandelter Ratten.....	63
4.4	Fehlende Induktion von C5a-Rezeptoren durch LPS in kultivierten Hepatocyten aus normaler Rattenleber.....	63
4.4.1	Optimierung der Bedingungen zur Kultivierung von primären Rattenhepatocyten.....	63
4.4.2	Fehlende Induktion von C5aR-mRNA und -Protein durch LPS in kultivierten Hepatocyten.....	65
4.5	Induktion funktioneller C5a-Rezeptoren durch Interleukin-6 und Interleukin-1β, jedoch nicht durch Tumor-Nekrose-Faktorα in kultivierten Hepatocyten.....	66
4.5.1	Induktion von C5aR-mRNA und -Protein durch IL-6 in kultivierten Hepatocyten.....	66
4.5.2	Induktion von C5aR mRNA- und -Protein Expression durch IL-1 β jedoch nicht durch TNF α in kultivierten Hepatocyten.....	67
4.5.3	Direkte Prostanoid-unabhängige Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase durch C5a in IL-6- und IL-1 β -, jedoch nicht in TNF α - oder LPS-stimulierten Hepatocyten.....	69
5.	DISKUSSION.....	71
5.1	Induktion von C5a-Rezeptoren unter verschiedenen pathologischen Bedingungen.....	71
5.2	Entzündungsmodelle: Experimentelle Simulation von Entzündungen durch LPS als Entzündungsauslöser und Interleukin-6 als Entzündungsmediator.....	73
5.2.1	Experimentelle Entzündungen simuliert durch LPS	73
5.2.2	Experimentelle Entzündungen simuliert durch IL-6	74
5.3	Induktion von C5a-Rezeptoren in Hepatocyten der Rattenleber unter experimentellen Entzündungsbedingungen.....	75
5.4	Vermittlung des LPS-Effektes.....	76
5.4.1	Fehlende direkte Wirkung von LPS auf die C5aR-Expression in Hepatocyten.....	76

5.4.2	Direkte Induktion von C5a-Rezeptoren in Hepatocyten durch IL-6 und IL-1 β	77
5.4.3	Mögliche Vermittlung der LPS-stimulierten C5aR-Expression durch LPS-abhängige Freisetzung proinflammatorischer Cytokine aus Kupferzellen.....	78
5.5	Bedeutung der <i>de novo</i> C5a-Rezeptor-Expression in Hepatocyten für die Regulation von Abwehrreaktionen.....	78
	LITERATURVERZEICHNIS.....	81

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1	Schematische Darstellung des Lebergewebes	4
Abb 2	Bildung und Funktion der Anaphylatoxine	6
Abb.3	Regulation Anaphylatoxin C5a-abhängiger Abwehrreaktionen in der Leber unter normalbedingungen	7
Abb.4	Schematischer Aufbau der Lipopolysaccharide (LPS) Gram-negativer Enterobakterien <i>Escherichia coli</i> und <i>Salmonella enterica</i>	10
Abb.5	Mögliche Beteiligung des Toll-like Rezeptors an der LPS-induzierten Signalvermittlung in mononukleären Phagozyten	11
Abb.6	Aufbau der Perfusioneinheit	22
Abb.7	Schematische Darstellung der polymerase-Kettenreaktion	32
Abb.8	Schematische Darstellung eines Fluorescence-activated Cell-sorter	46
Abb.9	Induktion von C5aR-mRNA in frisch isolierten HC nach <i>in vivo</i> Behandlung von Ratten mit LPS	50
Abb.10	Induktion von C5aR-Protein in frisch isolierten HC nach <i>in vivo</i> Behandlung von Ratten mit LPS (FACS-Analyse)	52
Abb.11	Induktion von C5aR-Protein in frisch isolierten HC nach <i>in vivo</i> Behandlung von Ratten mit LPS (Immuncytochemie)	53
Abb.12	Direkte C5a-abhängige Steigerung der Glykogen-Phosphorylase-Aktivität in frisch isolierten HC nach <i>in vivo</i> Behandlung von Ratten mit LPS	54
Abb.13	Fehlende Hemmung der C5a-abhängige Glucose-Freisetzung durch Indomethacin und daltroban in perfundierten Lebern nach <i>in vivo</i> -Behandlung von Ratten mit LPS	56

Abb.14	Induktion von C5aR-mRNA in frisch isolierten HC nach <i>in vivo</i> Behandlung von Ratten mit IL-6	58
Abb.15	Induktion von C5aR-Protein in frisch isolierten HC nach <i>in vivo</i> Behandlung von Ratten mit rhIL-6 (FACS-Analyse)	59
Abb.16	Induktion von C5aR-Protein in frisch isolierten HC nach <i>in vivo</i> Behandlung von Ratten mit rhIL-6 (Immuncytochemie)	60
Abb.17	Direkte C5a-abhängige Steigerung der Glykogen-Phosphorylase-Aktivität in HC aus IL-6-behandelten Ratten	62
Abb.18	Fehlende Hemmung der C5a-abhängige Glucose-Freisetzung durch Indomethacin und Daltroban in perfundierten Lebern nach <i>in vivo</i> -Behandlung von Ratten mit rhIL-6	64
Abb.19	Fehlende Expression von C5aR-mRNA nach <i>in vitro</i> -Stimulation mit LPS in kultivierten Hepatocyten	65
Abb.20	Expression von C5aR-mRNA durch IL-6 in kultivierten Hepatocyten <i>in vitro</i>	66
Abb.21	Expression von C5aR-Protein durch IL-6 in kultivierten Hepatocyten <i>in vitro</i> (FACS-Analyse)	67
Abb.22	Induktion von C5aR-mRNA durch die proinflammatorischen Cytokinen IL-1 β und TNF α in kultivierten Hepatocyten <i>in vitro</i>	68
Abb.23	Induktion von C5aR-Protein durch die proinflammatorischen Cytokine IL-1 β und TNF α in kultivierten Hepatocyten <i>in vitro</i>	69
Abb.24	Direkte C5a-abhängige Steigerung der Glykogen-Phosphorylase-Aktivität in kultivierten Hepatocyten nach <i>in vitro</i> -Stimulation mit IL-6 und IL-1 β , jedoch nicht mit TNF α und LPS	70
Abb.25	Regulation Anaphylatoxin C5a-abhängiger Abwehrreaktionen in der Leber unter Entzündungsbedingungen	72

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abe	D-Abequose (3,6-Didesoxy-D-Galaktose)
AP1	activator protein
bp	Basenpaare
C/EBP β	CAAT/enhancer binding protein
C5aR	C5a-Rezeptor
cDNA	kopierte (copy) Desoxyribonukleinsäure
CR	Cysteinreiche Region
CYR	Cytokin-Rezeptoren
ddNTPs	Didesoxynukleotide
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilo-N,N,N',N'-Tetra-Acetat
EP1R	Prostaglandin E2-Rezeptor Subtyp 1
FACS	Fluorescence-activated Cell-Sorter
FITC	Fluoresceinisothiocyana
FPR	Prostaglandin F 2α -Rezeptor
FS	Forward Scatter
Gal	Galaktose
Glc	Glucose
Glc-DH	Glucose-Dehydrogenase
GLcN	Glukosamin
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glucosamin
GPH	Glykogen-phosphorylase
HC	Hepatocyten
Hep	L-Glycero-D-manno-Heptose
HEPES	2-(-4-2-Hydroxyethyl)-Piperaziny-1-Ethansulfonat
<i>i.p</i>	intraperitoneal
IL-1R	IL-1-Rezeptor
ICE	IL-1 β -convertierendes Enzym
IP $_3$	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
KC	Kupfferzellen
kDa	Kilodalton

Kdo	“2-Keto-3-deoxyoctulosonsäure“ (3-Deoxy-D-manno-Octulosonsäure)
LBP	LPS-Bindungsprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche “repeat“-Domäne
Man	Mannose
MAP-Kinase	mitogen activated protein kinase
mCD14	Membran-assoziiertes CD14
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
NF- κ B	nuklear factor κ B
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PSC	Perisinusoidalzellen
rhIL-1 β	rekombinantes humanes Interleukin-1 β
rhTNF α	rekombinantes humanes Tumor-Nekrose-Faktor α
Rha	L-Rhamnose (6-Desoxy-L-Mannose)
rhIL-6	rekombinantes humanes Interleukin-6
PE	R-Phycoerythrin
rr IL-6	rekombinantes Ratten Interleukin-6
rrC5a	rekombinantes Ratten C5a
RSA	Rattenserumalbumin
RT-PCR	Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction
SEC	sinusoidale Endothelzellen.
SEM	standard error of the mean (Standartfehler des Mittelwertes)
SS	Side Scatter
TEMED	N', N', N', N'-Tetramethyldiamin
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor-4
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Lösung
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor- α TNF α

ZUSAMMENFASSUNG

In der normalen Rattenleber werden Anaphylatoxin C5a-Rezeptoren (C5aR) ausschließlich von Nichtparenchymzellen - und zwar stark von Kupfferzellen und hepatischen Sternzellen, schwächer von sinusoidalen Endothelzellen - exprimiert, nicht jedoch von Hepatocyten. Es war bekannt, daß eine Infusion von LPS zu einer erhöhten C5aR-Expression in Lebern von Ratten und Mäusen führte. In diesen Studien wurde nicht geklärt, welcher Zelltyp vermehrt C5aR exprimiert. Daher wurde postuliert, daß der beobachtete Effekt - zumindest zum Teil - Resultat einer *de novo*- Expression von C5aR in Hepatocyten sein könnte.

Tatsächlich löste eine *in vivo*-Behandlung von Ratten mit LPS, die eine Entzündungssituation simuliert, eine zeitabhängige Expression von C5aR-mRNA und -Protein in Hepatocyten aus. Zum Zeitpunkt der stärksten Protein-Expression - d.h. nach 8-10 h - waren die neu exprimierten C5a-Rezeptoren auch funktionell. RrC5a aktivierte in isolierten Hepatocyten aus LPS-behandelten Ratten im Unterschied zu Kontrolltieren direkt die Glykogen-Phosphorylase und setzte in perfundierten Lebern Prostanoid-unabhängig Glucose frei.

Anders als bei Applikation *in vivo*- induzierte LPS in kultivierten Hepatocyten aus normaler Rattenleber keine C5aR; eine direkte Wirkung auf Hepatocyten wurde daher ausgeschlossen. Höchstgeeignete Kandidaten für die Rolle als Mediatoren der LPS-Wirkung auf Hepatocyten sind die proinflammatorischen Cytokine IL-6, IL-1 β und TNF α , die nach Aktivierung durch LPS aus zirkulierenden Monocyten/ Makrophagen aber auch aus Nichtparenchymzellen der Leber freigesetzt werden. Tatsächlich induzierte eine *in vivo*-Behandlung von Ratten mit IL-6 - ähnlich wie eine LPS-Behandlung, jedoch mit leicht unterschiedlicher Kinetik - eine zeitabhängigen C5aR-Rezeptor-Expression in Hepatocyten. Auch hier steigerte rrC5a direkt die Aktivität der hepatozellulären Glykogen-Phosphorylase in isolierten Zellen und Prostanoid-unabhängig die Glucose-Freisetzung in perfundierten Lebern.

Anders als LPS iduzierte IL-6 auch in kultivierten Hepatocyten *in vitro* die Expression funktioneller C5aR. Die weiteren Cytokine IL-1 β und TNF α wurden wegen ihrer hohen Toxizität *in vivo* nur in *in vitro*-Experimenten eingesetzt: hier induzierte IL-1 β in vergleichbar starkem Maße wie IL-6 funktionelle C5a-Rezeptoren. Eine *in vitro*-Stimulation von Hepatocyten mit TNF α induzierte dagegen keine signifikanten Mengen C5aR-mRNA und -Protein.

Die Resultate zeigen, daß Hepatocyten unter Entzündungsbedingungen funktionelle Anaphylatoxin-C5a-Rezeptoren *de novo* exprimieren. Möglicherweise wird dieser Effekt primär durch die aus Makrophagen wie Kupfferzellen sezernierten Entzündungsmediatoren IL-6 und IL-1 β vermittelt. Die *de novo* Expression von C5aR auf Hepatocyten hat entscheidende Konsequenzen für die Regulation hepatozellulärer Abwehrreaktionen wie der Freisetzung

von Glucose als Energiequelle und Vorstufe für die Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate: Sie wird unter Normalbedingungen indirekt durch Prostaglandine aus Nichtparenchymzellen, unter Entzündungsbedingungen jedoch durch direkte Wirkung von C5a auf die Hepatocyten induziert. Diese Befunde unterstreichen die entscheidende Rolle von Anaphylatoxinen wie C5a für die Regulation nicht nur systemischer sondern auch hepatischer Abwehrreaktionen.

1. EINLEITUNG

1.1 Aufgaben der Leber

Die Leber ist das zentrale Organ des Intermediärstoffwechsels. Sie sichert die Energieversorgung durch Aufnahme und Freisetzung von Glucose, Aminosäure-Katabolismus, Lipid-Prozessierung und Ketonkörper-Synthese, reguliert das Plasmavolumen durch Biosynthese und Abbau von Plasmaproteinen, unterstützt die Verdauung durch Freisetzung von Gallensäuren und fungiert als Kontrollstelle des Hormonsystems sowie als Hauptblutreservoir. Weiterhin übernimmt die Leber sensorische Funktionen im Energie-, Elektrolyt- und Wasserhaushalt [Jungermann und Kietzmann, 1996].

Eine zentrale Funktion der Leber ist auch die Beteiligung an der biochemischen und Immun-Abwehr. Über die *Vena portae* erreichen Xenobiotika, Toxine und invasive Pathogene die Leber. Sie werden aufgenommen und durch Oxidation, Reduktion und Konjugation verstoffwechselt und/oder ausgeschieden [Jungermann und Kietzmann, 1996]. Schließlich unterstützt die Leber systemische und lokale Abwehrreaktionen durch eine vermehrte Glucose-Freisetzung oder eine veränderte Synthese von Akut-Phase-Proteinen. Die vermehrt freigesetzte Glucose kann als Elektronen-Donor für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und/oder als Kohlenstoffquelle im partiell hypoxischen Entzündungsgebiet dienen. Die vermehrt freigesetzten "positiven" Akut-Phase-Proteine (wie C-reaktives Protein und Serum-Amyloid A im Mensch und α_2 -Makroglobulin, Cystein-Protease-Inhibitor und β -Fibrinogen in der Ratte) sind meist Protease-Inhibitoren, die die Entzündung lokalisieren und weiteren Gewebeschädigungen vorbeugen. Die Verminderung der Expression einiger "negativen" Akut-Phase-Proteine könnte die Bereitstellung von Nukleotiden und Aminosäuren für die Synthese positiver Akut-Phase-Proteine dienen oder kompensatorisch die Aufrechterhaltung des kolloid-osmotischen Drucks bewirken (Albumin) [Heinrich et al., 1990; Löffler and Petrides, 1990]; andere "negative" Akut-Phase-Proteine haben Transportfunktionen (Transferrin) [Löffler and Petrides, 1990].

1.2 Aufbau der Leber

Die vielfältigen Funktionen der Leber werden oft durch komplexe Wechselwirkungen zwischen den fünf wichtigsten Leber-Zelltypen realisiert.

Die Parenchymzellen oder Hepatocyten machen 90% der Zellmasse und 60% der Zellzahl in der Leber aus [Blouin et al, 1977]. Die Hepatocyten sind polare Zellen mit einer

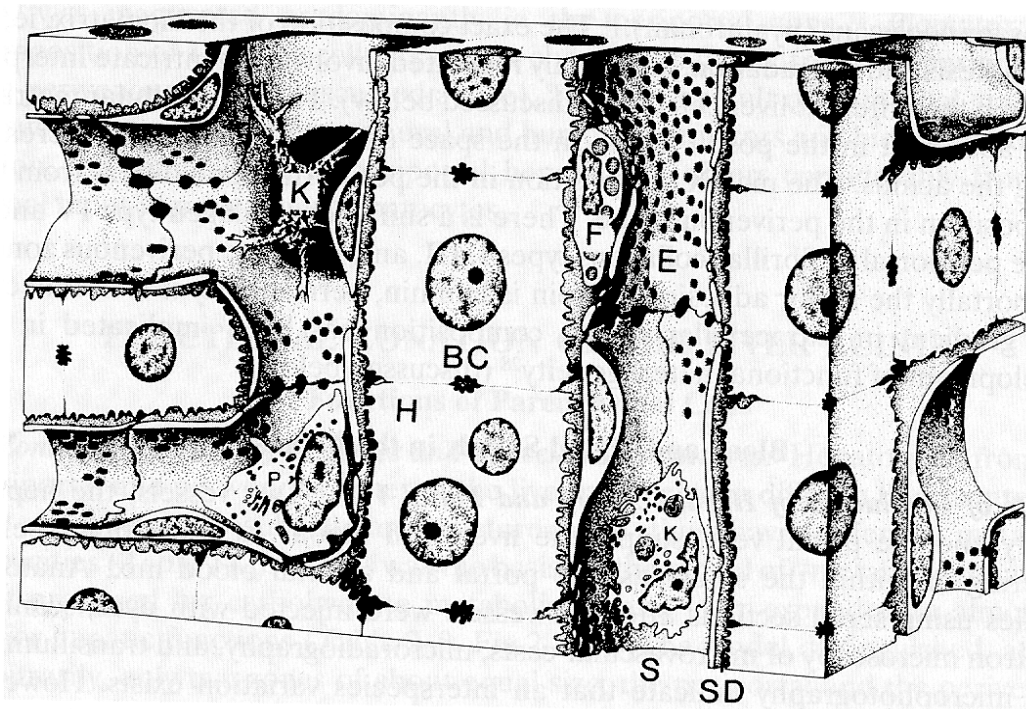


Abb. 1: Schematische Darstellung des Lebergewebes. Das Parenchym besteht aus Zellbalken, die von benachbarten Hepatocytten (H) gebildet werden. Dazwischen liegen die blutgefüllten Sinusoide (S), die von den fenestrierten Endothelzellen (E) ausgekleidet werden. Kupferzellen (K) und Pitzellen (P) liegen innerhalb des Sinusoids den Endothelzellen an. Zwischen den Hepatocytten und den Endothelzellen der Sinuswände befindet sich der Disse'sche Raum (SD), in dem die "fettspeichernden" Perisinusoidalzellen (F) sowie die extrazelluläre Matrix lokalisiert sind. Mit ihrer apikalen Plasmamembran bilden die Hepatocytten die Gallenkanälchen, Canaliculi biliferi (BC) [nach Sasse et al., 1992]

apikalen und einer basalen Membran. Die apikalen Membranen zweier benachbarter Hepatocytten bilden ein Gallenkanälchen [Sasse et al., 1992]. Die basale Membran liegt dem mit Endothel ausgekleideten Sinusoid gegenüber. Zwischen den Hepatocytten und Endothelzellen befindet sich der Disse'sche Raum, der als Kommunikationsort zwischen den Parenchym- und Nichtparenchymzellen dient (Abb.1).

Die Nichtparenchymzellen umfassen die sinusoidalen Endothelzellen (70%), die Kupferzellen (20%), die Perisinusoidalzellen (10%) und die Pitzellen (1%) (Abb.1).

Die sinusoidalen Endothelzellen bilden die Wände der Sinusoide. Im Unterschied zu den vaskulären sind die sinusoidalen Endothelzellen fenestriert. Die Fenestrae (\varnothing 100-200 nm) erlauben den Austausch niedermolekularer Substrate zwischen Sinusoid und Disse'schem Raum, halten aber zelluläre Bestandteile (Blutzellen) und hochmolekulare Partikel (z.B. Chylomikronen, \varnothing 800-1000 nm) in den Sinusoiden zurück [Wisse, 1970]. Sinusoidale Endothelzellen sind weiterhin an der Adhäsion und Transmigration von Immunzellen beteiligt [Burt et al., 1993].

Die Kupfferzellen - die sessilen Lebermakrophagen - stellen 70% der Gesamt-Makrophagen im Körper. Sie liegen - den sinusoidalen Endothelzellen angeheftet - in den Sinusoiden und ragen mit ihren Fortsätzen in den Disse'schen Raum. Die Funktionen der Kupfferzellen sind Phagozytose makromolekularer Fremdstoffe und Antigenpräsentation [Roitt et al., 1996], sowie Freisetzung von Cytokinen, Prostanoiden und reaktiven Sauerstoffspezies [Grewe et al., 1992; Busam et al., 1990; Bhatnagar et al., 1981].

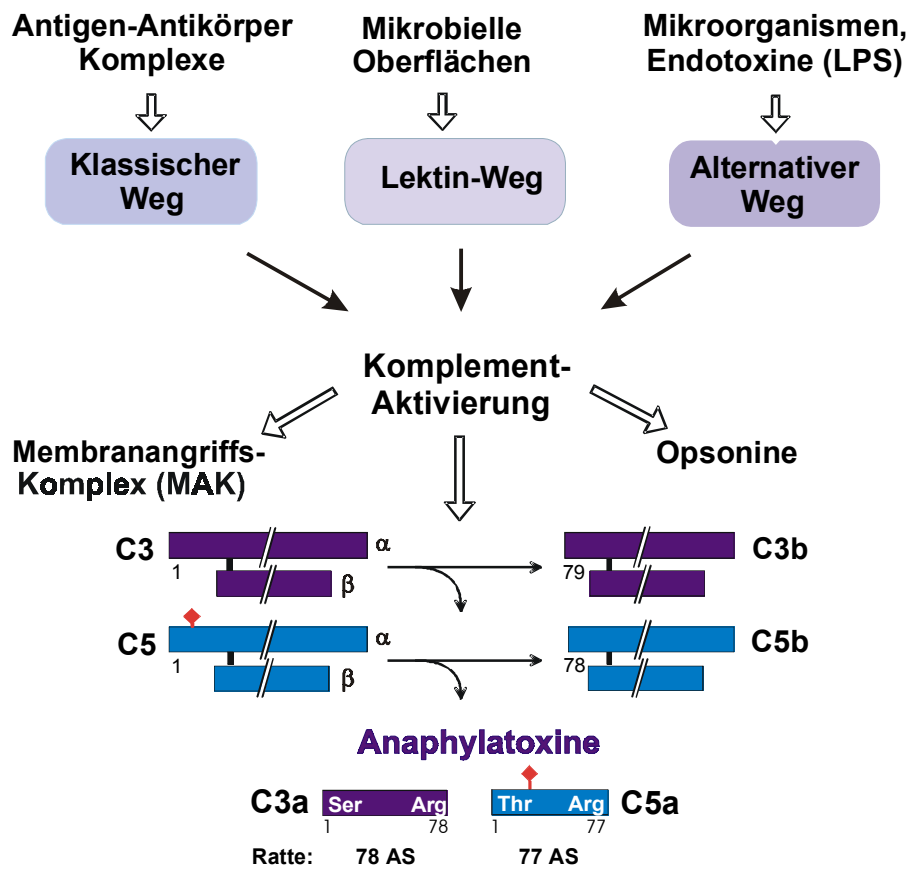
Die Perisinusoidalzellen (hepatische Sternzellen, Itozellen) befinden sich im Disse'schen Raum. Sie sind Vitamin A-Speicher und synthetisieren Matrixproteine [Bouwens et al., 1992].

Die Pitzellen sind große granuläre Lymphocyten, die an der luminalen Oberfläche des Sinusoids angeheftet sind und natürliche Killerzell-Aktivität besitzen [Wisse et al., 1970; Burt et al., 1993].

1.3 Entzündungs-Auslöser und -Mediatoren in der Leber und deren Rezeptoren

1.3.1 Anaphylatoxin C5a und C5a-Rezeptoren (C5aR) [CD88]

Das Komplementsystem besteht aus verschiedenen Plasmaproteinen, deren Bildungsort die Hepatocyten sind [Anthony et al., 1985, Ramadori et al., 1984]. Die Komplementkaskade kann auf 3 verschiedene Weisen aktiviert werden: auf klassischem Weg durch Antigen-Antikörper-Komplexe, auf dem Lektin-Weg durch Mannan-bindende Lektin-assoziierte Serinproteasen (MASP-1 und MASP-2) oder auf alternativem Weg durch mikrobielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharide (Gram-negative Bakterien) oder Zymosan (Hefen). Während der Komplement-Aktivierung werden von den N-Termini der α -Untereinheiten der dritten (C3) und der fünften (C5) Komplementkomponente proteolytisch mittels Proteinkomplexen (C3- bzw. C5-Konvertase) die sogenannten Anaphylatoxine C3a und C5a abgespalten (Abb.2). Beide Peptide besitzen je einen Arginin-Rest am C-Terminus und befinden sich unter der Kontrolle spezifischer Carboxypeptidasen. Durch Abspaltung des terminalen Arginin wird C3a sekundenschnell in seine inaktive (C3a des-Arg) Form umgewandelt und kann vermutlich deswegen nur lokal seine Wirkungen ausüben [Eisen, 1990]. C5a dagegen bleibt auch nach Abspaltung des Argininrestes (C5a des-Arg) zumindest teilweise aktiv: 10^{-8} - 10^{-7} M C5a-desArg hatte eine ähnlich große chemotaxische Wirkung auf Leukocyten wie 10^{-9} - 10^{-10} M des intakten humanen C5a[Fernandez and Hugli, 1978].



Funktion:

- | | |
|---------------------------------|--|
| Blutgefäße | Permeabilitätserhöhung |
| Glatte Muskulatur | Kontraktion |
| Mastzellen | Degranulierung |
| Makrophagen, Neutrophile | Aktivierung, Chemotaxis |
| Leber | Glucose-Freisetzung |
| | Synthese von Akut-Phase-Proteinen |

Abb.2: Bildung und Funktion der Anaphylatoxine.

C5a ist ein Glykopeptid (human 74 AS, [Fernandez and Hugli, 1987]; Ratte 77 AS, [Rothermel et al, 1997]) mit sechs zwischen den Spezies konservierten Cysteinresten, die intramolekulare S-S-Brücken bilden [Zuiderweg et al., 1989; Williamson et al., 1990]. Die systemischen und lokalen Wirkungen von C5a sind vielfältig (Abb.2): C5a kontrahiert die glatte Muskulatur [Cui et al., 1994], erhöht die Gefäßpermeabilität und setzt Histamin aus Mastzellen frei; es wirkt chemotaktisch und aktiviert Neutrophile und Makrophagen, die infolgedessen zum Entzündungsort wandern und lokal reaktive Sauerstoffspezies, Prostanoiden und Cytokine ausschütten [Eisen, 1990].

Die Wirkungen von C5a in der Leber wurden erst in den letzten Jahren untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß C5a Prostanoiden (Prostaglandine und Thromboxan) aus

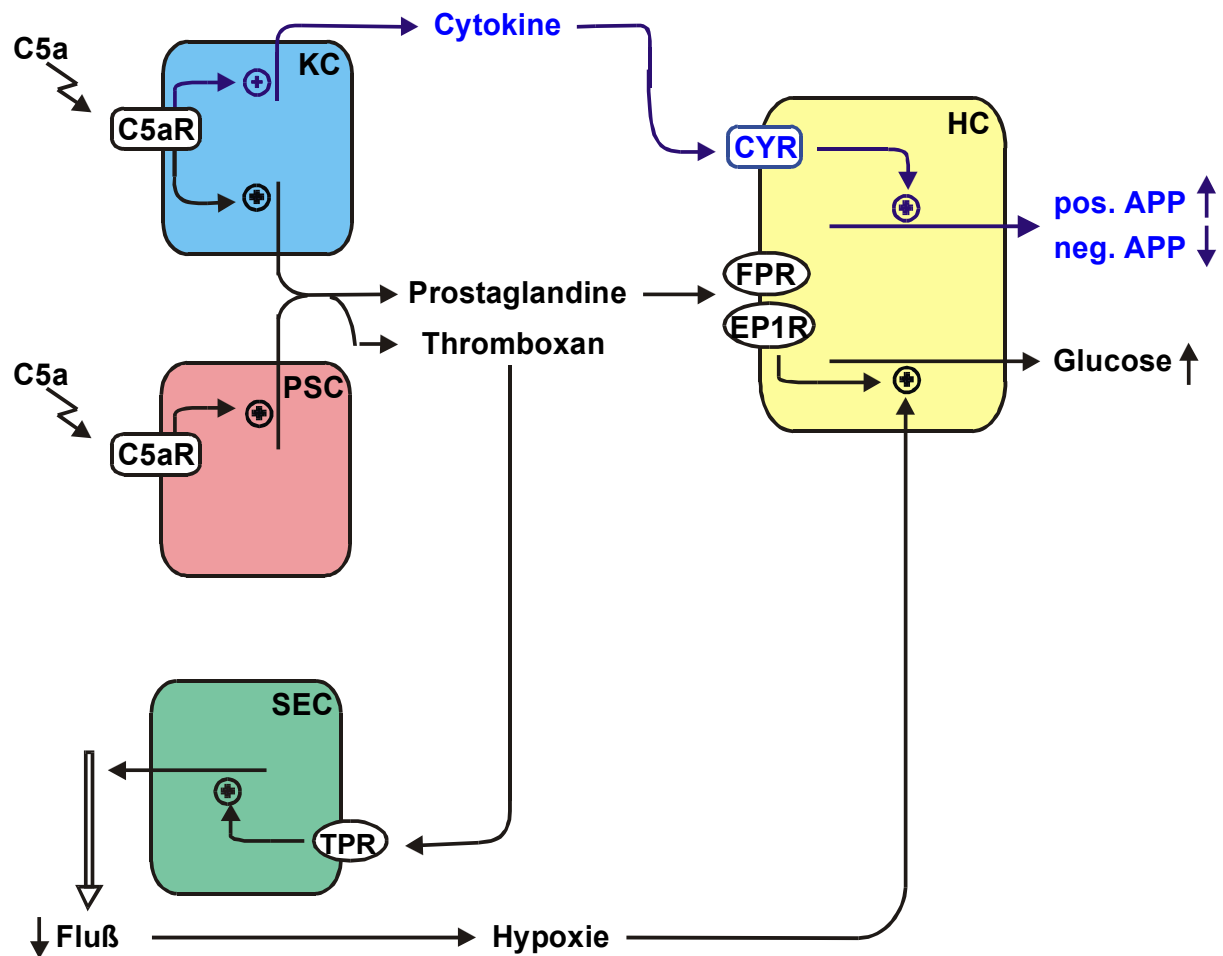


Abb.3: Regulation Anaphylatoxin C5a-abhängiger Abwehrreaktionen in der Leber unter Normalbedingungen. C5aR: C5a-Rezeptor; CYR: Cytokin-Rezeptoren; FPR: Prostaglandin F₂ α -Rezeptor; EP1R: Prostaglandin E₂-Rezeptor Subtyp 1; HC: Hepatocyten; KC: Kupferzellen; PSC: Perisinusoidalzellen; SEC: sinusoidale Endothelzellen.

Kupferzellen und Perisinusoidalzellen freisetzte und in Kokulturen dieser Zellen mit Hepatocyten, nicht aber in Hepatocyten-Monokulturen, Prostanoid-vermittelt die Glykogenphosphorylase aktivierte [Hespeling et al., 1995; Schieferdecker et al., 1998]. Auch in der perfundierten Rattenleber erhöhte C5a Prostanoid-abhängig die Glucose-Abgabe, darüberhinaus reduzierte C5a - ebenfalls Prostanoid-abhängig - die Flußrate: beide Effekte waren in Gegenwart des Prostanoidsynthese-Inhibitors Indomethacin und des Thromboxan A₂-Rezeptor-Antagonisten Daltroban vollständig gehemmt [Schieferdecker et al., 1997b; Schieferdecker et al., 1999]. Da Hepatocyten Prostaglandinrezeptoren, jedoch keine Thromboxan-Rezeptoren exprimierten [Fennekohl et al., 1999; Püschel et al., 1997], konnten Prostaglandine die Glucose-Abgabe direkt erhöhen während Thromboxan die Wirkung der Prostaglandine indirekt durch die aus der Flußreduktion resultierende Hypoxie steigerte [Schieferdecker et al., 1999] (Abb.3).

Neben der Erhöhung der Glucose-Abgabe bewirkte das Anaphylatoxin C5a - gemeinsam mit LPS - auch eine stark vermehrte Expression des Gens des Akut-Phase-Proteins α_2 -Macroglobulin in Hepatocyten. Auch dieser Effekt wurde ebenso indirekt vermittelt: in diesem Fall jedoch nicht durch Prostanoiden sondern durch das proinflammatorische Cytokin IL-6 aus Kupferzellen [Mäck et al., 1999]. Das heißt, daß C5a unter Normalbedingungen Effektorfunktionen von Hepatocyten nur indirekt durch aus Nichtparenchymzellen sezernierte Mediatoren (Prostanoiden und Cytokine) regulieren konnte.

Die Rezeptoren für humanes [Gerard and Gerard, 1991] und Ratten C5a [Akatsu et al., 1997, Rothermel et al., 1997] sind kloniert. Sie gehören zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen und wirken über eine Steigerung der intrazellulären Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) - und Ca^{2+} -Konzentration. Für den C5a-Rezeptor sind ein Pertussis-Toxin-sensitiver [Siciliano et al., 1990; Shirato et al., 1988], sowie ein Pertussis-Toxin-resistenter [Hsu et al., 1999; Shum et al., 1995; Amatruda et al., 1993] Signaltransduktionsweg bekannt. Ursprünglich wurde vermutet, daß C5a-Rezeptoren ausschließlich von Zellen der myeloischen Reihe, wie Neutrophilen [Chenoweth and Hugli, 1978], Eosinophilen [Gerard et al., 1989], Basophilen [Kurimoto et al., 1989] und Monocyten [Werfel et al., 1992] exprimiert werden. In den letzten Jahren mehren sich jedoch die Daten über eine Expression auch in nicht-myeloischen Zellen: So wurde zunächst eine konstitutive C5aR-Expression für humane Astrocyten beschrieben [Gasque et al., 1995]. Dann wurde berichtet, daß in der gesunden Rattenleber neben den Kupferzellen auch Perisinusoidalzellen - stark - und sinusoidale Endothelzellen - schwach - nicht jedoch die Hepatocyten C5a-Rezeptoren [Schieferdecker et al., 1997; Schlaf et al., 1999] exprimierten. Schließlich wurden C5aR in mesangialen sowie proximal tubulären Nierenzellen [Wilmer et al., 1998; Braun et al., 1998; Fayyazi et al., 2000] und neuronalen Zellen [Farkas et al., 1998] nachgewiesen, für T-Lymphocyten ist ihre Expression umstritten [Werfel et al., 1992; Nataf et al., 1998].

In verschiedenen Studien induzierte LPS eine vermehrte Expression von C5a-Rezeptoren in der Mäuse- [Haviland et al., 1995] bzw. Rattenleber [Akatsu et al., 1997; Fukuoka et al., 1998]. Nicht untersucht wurde allerdings, in welchem Zelltyp vermehrt C5a-Rezeptoren exprimiert wurden. Möglich wäre eine *de novo*-Expression auf den unter Normalbedingungen C5a-Rezeptor-freien Hepatocyten. Eine induzierbare C5aR-Expression in Hepatocyten würde gestützt durch die Beobachtung einer hepatozellulären C5aR-Expression in humanen Lebern nicht-deklarer Herkunft, die möglicherweise pathologisch verändert waren [Haviland et al., 1995] und einer C5aR-Expression in Hepatom-Zelllinie aus Mensch (HepG2) [Buchner et al., 1995; McCoy et al., 1995] und Ratte (FAO und H4IIE) [Schlaf et al., 1999].

1.3.2 Bakteriell Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin) und LPS-Rezeptoren

Lipopolysaccharide sind Bestandteile der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, zu denen sowohl kommensale als auch pathogene Keime gehören. Sie sind hitzestabile amphiphile Moleküle, die sich aus einer hydrophoben Region - dem Lipoid A - und einem kovalent gebundenen hydrophilen Heteropoly- oder Heterooligosaccharidanteil zusammensetzen (Abb.4). Die in der äußeren Bakterienmembran verankerte Lipoid A stellt das endotoxisch aktive Zentrum des LPS dar. Die Polysaccharidregion besteht aus einer terminalen "O-spezifischen Kette" - einer Substruktur aus bis zu 50 sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten von 2-8 Monomeren - und einer Kernregion, die an das Lipoid A gebunden ist. Charakteristisch für die O-spezifische Kette ist eine extrem hohe Strukturvariabilität zwischen verschiedenen Spezies, die die Basis für die serologische Klassifizierung individueller Bakterienstämme nach den O-Determinanten bildet [Alexander and Rietschel, 1999].

In höheren Organismen hat LPS verschiedene erwünschte Effekte wie eine Stimulation der angeborenen Immunität; in höheren Dosen verursacht LPS jedoch schwere pathophysiologische Störungen, die als Endotoxämie und Gram-negative Sepsis bekannt sind.

Bei Säugetieren bildet die Darmmukosa eine effektive Barriere, die die Translokation nur sehr geringer Mengen an LPS Darm-assoziiierter Gram-negativer Bakterien in die Zirkulation erlaubt (Normalwerte im peripheren Plasma beim Menschen: 3-10 pg LPS/ml) [Alexander und Rietschel, 1999]. Dieser mit den Nahrungslipiden konstitutiv resorbierte Anteil des gastrointestinalen LPS wird über das Pfortadersystem zur Leber transportiert, und dort durch Kupffer- und sinusoidalen Endothelzellen bzw. über den Gallenweg entfernt [Alexander and Rietschel, 1999; Praaning-van Dalen et al., 1981; Ruitter et al., 1981]. Unter pathologischen Bedingungen (Endotoxinämie, Gram-negative Sepsis) sind bis zu 400 pg LPS/ml im peripheren Plasma nachweisbar [Alexander and Rietschel, 1999].

LPS-Aggregate werden in der Zirkulation durch ein LPS-Bindungsprotein (LBP), das von Hepatocyten sezerniert wird [Su et al., 1994] opsoniert und zu löslichen (sCD14) oder Glykosyl-Phosphatidylinositol-verankerten 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 von assoziierten Rezeptoren - dem Toll-like Rezeptor-4 [Chow et al, 1999] und möglicherweise auch Toll-like Rezeptor-2 [Kirschning et al, 1998] in die Zelle übertragen (Abb.5). Bei höheren LPS-Konzentrationen (>100 ng/ml) sind mononukleäre Phagozyten *in vitro* auch auf CD14-unabhängige Weise durch

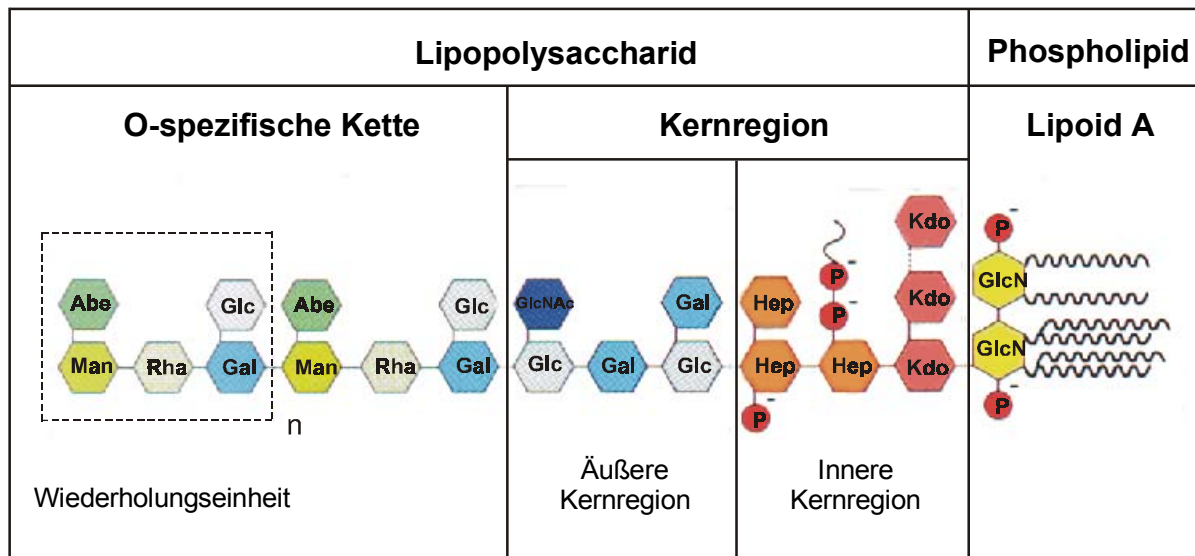


Abb.4. Schematischer Aufbau der Lipopolysaccharide (LPS) Gram-negativer Enterobakterien *Escherichia coli* und *Salmonella enterica*. Abe: Abequose; Gal: Galaktose; Glc: Glucose; GLcN: Glukosamin; GlcNAc: N-Acetyl-D-Glucosamin; Hep: L-Glycero-D-manno-Heptose; Kdo: "2-Keto-3-deoxyoctulosonsäure" (3-Deoxy-D-manno-Octulosonsäure); Man: Mannose; P: Phosphat; Abe: D-Abequose (3,6-Didesoxy-D-Galaktose; Rha: L-Rhamnose (6-Desoxy-L-Mannose); (nach Alexander und Rietschel, 1999; Buddecke, 1985)

Scavenger-Rezeptoren oder $\beta 2$ -Integrine - aktivierbar [Fenton and Golenbock, 1998]. In der Leber wird CD14 von sinusoidalen Endothelzellen [Scaozec et al, 1994] konstitutiv exprimiert. In Kupfferzellen wird durch LPS eine CD-14-Expression induziert [Tomita et al., 1994], die experimentelle Kupfferzellaktivierung durch LPS scheint aber CD14-unabhängig zu erfolgen [Bellezo et al., 1996]. Auch für Hepatocyten ist eine induzierbare CD14-Expression beschrieben [Liu et al., 1998]; ob Hepatocyten unter Normalbedingungen direkt durch LPS stimulierbar sind, ist umstritten [s. Diskussion].

1.3.3 Proinflammatorische Cytokine $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ und $IL-6$ und deren Rezeptoren

Die proinflammatorischen Cytokine Tumor-Nekrose-Faktor- α ($TNF\alpha$), Interleukin- 1β ($IL-1\beta$) und Interleukin-6 ($IL-6$) werden bei Entzündungen oder Gewebeschädigungen von aktivierten Monocyten / Makrophagen, Lymphocyten, Fibroblasten und Endothelzellen freigesetzt. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort. In der Leber sind sie Haupt-Auslöser der Akut-Phase-Reaktion [Ramadori and Christ, 1999; Bemelmans et al., 1996].

$TNF\alpha$ (17 kDa) wurde aus Serum LPS-behandelter Mäuse als löslicher Faktor isoliert, der hemorrhagische Nekrosen in transplantierten Tumoren verursachte [Carswell et

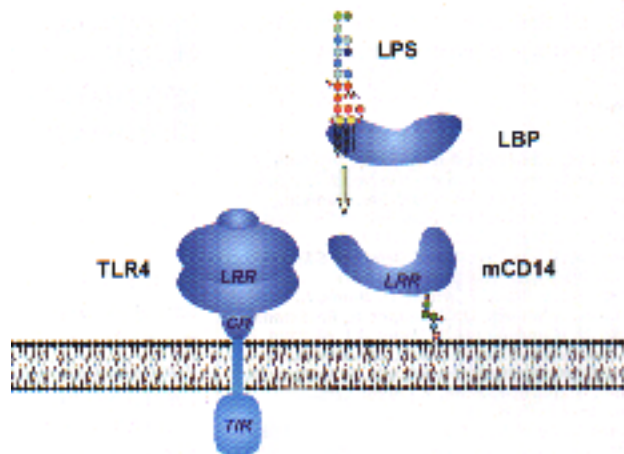


Abb.5: Mögliche Beteiligung des Toll-like Rezeptors an der LPS-induzierten Signalvermittlung in mononukleären Phagozyten. LPS: Lipopolysaccharid; LBP: LPS-Bindungsprotein; mCD14: Membran-assoziiertes CD14; TLR4: Toll-like Rezeptor-4; LRR: Leucin-reiche "repeat"-Domäne; CR: Cysteinreiche Region; TIR: Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne. (nach Alexander und Rietschel, 1999)

all., 1975]. Neben seiner Wirkung als "Antitumor-Faktor" ist für $\text{TNF}\alpha$ auch eine Funktion als Mediator des endotoxischen Schocks und als Apoptose-Auslöser bekannt [Simpson et al., 1997]. Außerdem verstärkt $\text{TNF}\alpha$ autokrin die Freisetzung von IL-6 aus Makrophagen, Kupffer- und Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinocyten [Heinrich et al., 1990; Akira et al., 1993; Barton, 1996] Im Endothel induziert $\text{TNF}\alpha$ die Expression von Adhäsionsmolekülen [Essani et al., 1995].

Es sind zwei Typen von TNF-Rezeptoren (TNF-R) bekannt. TNF-R2 (75 kDa) besitzt eine ca. 10-fach höhere Affinität ($K_d = 5 \times 10^{-11}$ M) für $\text{TNF}\alpha$ als TNF-R1 (55 kDa) [Stites et al., 1994]. Der TNF-R1 und der TNF-R2 unterscheiden sich in ihren intrazellulären Domänen und damit Signalwegen [Bemelmans et al., 1996]. TNF-Rezeptoren werden hauptsächlich von mononukleären Phagozyten und Gewebsmakrophagen exprimiert. In der Leber sind in Kupferzellen TNF-R1 [Zhang et al., 1994] und in Hepatocyten TNF-R1 und TNF-R2 [Adamson et al., 1994] nachgewiesen.

IL-1 β wird als biologisch inaktives Propeptid (Pro-IL-1 β , 31 kDa) synthetisiert und durch IL-1 β -convertierendes Enzym (ICE), eine intrazelluläre Cysteinproteinase, zu seiner aktiven Form (17 kDa) prozessiert [Ceretti DP et al., 1992]. Daneben kann Pro-IL-1 β auch von extrazellulären Proteasen gespalten werden [Fantuzzi-Giamilia et al., 1999; Boraschi et al., 1995]; diese sind jedoch weniger aktiv als ICE. Ähnlich wie $\text{TNF}\alpha$ kann IL-1 β autokrin die Freisetzung von IL-6 aus Makrophagen, Kupffer- und Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinocyten stimulieren und auf diese Weise die IL-6-Effekte verstärken [Heinrich et al., 1990; Akira et al., 1993; Barton, 1996]. Weiterhin induziert IL-1 β die Synthese von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen [Lukacs et al., 1994; Lukacs et al., 1995].

Die IL-1-Rezeptoren (IL-1R) Typ I und II gehören zur Immunoglobulin-Superfamilie. IL-1R Typ I besitzt eine glykosylierte extrazelluläre Domäne mit 3 IgG-ähnlichen Loops, sowie eine cytoplasmatische Domäne. Die extrazelluläre Domäne bindet IL-1 α , pro-IL-1 α und IL-1 β jedoch nicht pro-IL-1 β . [Boraschi et al., 1995]. Die intrazelluläre Antwort von IL-1 β wird über die cytoplasmatische Domäne von IL1R Typ I vermittelt. Ob eine Signalvermittlung durch Bindung von IL-1 β zu dem IL-1R Typ II, der nur eine kurze intrazelluläre Domäne besitzt, möglich ist, ist umstritten [Oldenburg et al., 1995]. Auf mehreren Zelltypen werden die beiden Rezeptoren koexprimiert, sie sind aber funktionell unabhängig und bilden keine Heterodimere [Marmioli et al., 1998]. Hepatocyten exprimieren IL-1R Typ I [Ramadori and Christ, 1999].

In Hepatocyten stimulieren sowohl IL-1 β als auch TNF α , das zu den IL-1-ähnlichen Cytokinen gehört [Ramadori and Christ, 1999], die Expression von Akut-Phase-Proteinen durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (nuklear factor κ B) und AP1 (activator protein) über den Ceramid-Weg, bzw. C/EBP β (CAAT/enhancer binding protein) über den MAP-Kinase-Weg (mitogen activated protein kinase) [Ramadori and Christ, 1999].

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Glycopeptid, dessen Molekulargewicht zwischen 20 und 30 kDa variiert. Diese Heterogenität ist durch Zelltyp-spezifische posttranslationale Modifizierungen (N-, O- Glykosylierung oder Phosphorylierung) bedingt [May et al, 1988 a, b]. Wie IL-1 β und TNF α aktiviert IL-6 Monocyten/Makrophagen und Neutrophile und induziert die Synthese von Akut-Phase-Proteinen. Neben seinen proinflammatorischen Funktionen kann IL-6 durch Hemmung der Synthese von IL-1 β und TNF α auch anti-inflammatorisch wirken [Barton, 1996].

Der IL-6-Rezeptor (IL-6R) ist ein Heterotrimer und besteht aus einem IL-6-Bindungsprotein (IL-6R α , 80 kDa) und 2 signalübertragenden Glykoprotein-Untereinheiten mit 130 kDa (gp 130) [Hibi et al, 1995]. Lösliche IL-6-Rezeptoren (50-60 kDa) können nach Bindung von IL-6 über gp130 IL-6-Signale auch auf Zellen übertragen, die keine IL-6R α exprimieren [Peters et al., 1996]. IL-6 aktiviert über JAK-Kinasen (Janus-Kinasen) die STAT 3/5 (signal transducers and activators of transcription)-Transkriptionsfaktoren oder - wie TNF α und IL-1 β - über MAP-Kinasen C/EBP [Ramadori and Christ, 1999]. In der Leber stimuliert IL-6 ebenso wie TNF α und IL-1 β die Synthese von Akut-Phase-Proteinen [Ramadori and Christ, 1999; Baumann and Gauldie, 1994]. Dabei induziert IL-6 jedoch ein anderes Muster an Akut-Phase-Proteinen als TNF α und IL-1 β (IL-6-abhängige Typ 2 Akut-Phase-Proteine in der Ratte: z.B. α_2 -Makroglobulin, Fibrinogen; IL-1 β / TNF α -abhängige Typ1 Akut-Phase-Proteine in der Ratte: z.B. Hämopexin, Haptoglobin) [Ramadori and Christ, 1999; Baumann and Gauldie, 1994].

1.4 Aufgabenstellung

Nach intraperitonealer Injektion von LPS wurde eine vermehrte Expression von C5a-Rezeptor-mRNA in Lebern von Mäusen [Haviland et al., 1995] und Ratten [Akatsu et al., 1997; Fukuoka et al., 1998] beobachtet. Da nicht untersucht wurde, in welchem Zelltyp die vermehrte C5a-Rezeptor-Expression vorkam, war das Ziel der vorliegenden Arbeit zu klären, ob diese vermehrte Expression - zumindest teilweise - Resultat einer *de novo* Synthese von C5a-Rezeptoren in Hepatocyten sein könnte.

Um diese Frage zu beantworten, sollte untersucht werden:

1. ob eine *in vivo*-Gabe von LPS als Hauptauslöser entzündlicher Prozesse im Organismus eine *de novo* Expression von C5aR in Hepatocyten induziert,
2. ob ggfs. diese C5aR-Induktion Resultat einer direkten LPS-Wirkung auf die Hepatocyten ist oder ob proinflammatorische Cytokine wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β und IL-6 als Mediatoren fungieren können.

Der Nachweis der Rezeptor-Expression sollte

- i) auf mRNA-Ebene durch RT-PCR
- ii) auf Protein-Ebene durch Immuncytochemie und Durchflusscytometrie und
- iii) funktionell durch direkte C5a-abhängige Aktivierung der Glykogenphosphorylase in isolierten Hepatocyten bzw. direkte, Prostanoid-unabhängige Glucose-Freisetzung in der perfundierten Leber erfolgen.

2. MATERIALIEN

2.1 Tiere und Tierhaltung

Die Experimente wurden mit männlichen Wistar-Ratten (120-300 g) aus der Zucht der Firma Winkelmann (Borchen, Westfalen) durchgeführt. Die Tiere wurden frühestens 1 Woche nach dem Transport verwendet. Bis zum Versuch wurden sie in einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus (7-19 Uhr Hellphase) mit freiem Zugang zu Wasser und Futter (Rattendiät "Sniff", Spezialdiäten GmbH, Soest, Westfalen) gehalten. Die Raumtemperatur betrug 19-23°C, die Luftfeuchtigkeit ca. 50%. Alle Experimente wurden innerhalb der ersten 6-8 h der Hellphase durchgeführt.

Die Behandlung der Tiere wurde dem Tierschutzgesetz entsprechend durchgeführt. Die Organentnahme zur Zellisolierung wurde der Bezirksregierung Braunschweig am 26.11.1987 angezeigt, die intraperitonealen Injektionen mit LPS und IL-6 am 5.05.1998 (Registrierungsnummer 509.42502/01-25.98) behördlich genehmigt.

2.2 Geräte

Automatischer DNA-Sequenzer Modell 373 A	Applied Biosystems	Weiterstadt
Durchflußzytometer EPICS-XL	Coulter	Krefeld
Laborwaagen Sartorius Typ 2406, 2434, 1219 MP	Sartorius	Göttingen
Magnetrührer Ika-Combimag RET	Jahnke & Kunkel	Staufen i. Br.
Mikrowellengerät, Typ Privileg	Quelle	Fürth
Osmometer	Knauer & Co	Berlin
Perfusionseinheit:		
• Multiflex-Pumpe Typ M 80	Cole Parmer Instrument	USA
• Fraktionssammler Ultracac 7000	Pharmacia LKB	Freiburg
• Perfusor	Braun-Melsungen	Melsungen
pH-Meter, Typ CG 810	Schott	Mainz-Hofheim
Quarzdestille Destamat Bi 18e	Heraeus	Hanau
Spektralphotometer Ultrospec 4050	Pharmacia LKB	Freiburg

Sterilbankbank LaminAir TL 2472	Heraeus	Hanau
Sterilbank NUAIRE NU 440-600E	Zapf Instrumente	Sarstedt
Thermocycler TC2400	Perkin Elmer	Langen
Thermocycler UNO II	Biometra	Göttingen
Thermomixer, Typ 5436	Eppendorf	Hamburg
Ultraschall-Homogenisator Sonicator W 220	Heat Systems Ultrasonic	Plainview, USA
Videodensitometer	Biotec Fischer	Reiskirchen
Video Copy Processor:		
• Transiluminator UVP	Herolab	Wiesloch
• Videokamera DNA	Herolab	Wiesloch
Vakuumsystem:		
• Vakuumpumpe Univac	Uniequip	Martinsried
• Kühlfalle Unicryo MC 2L-60°C	Uniequip	Martinsried
• beheizbare Zentrifuge Univapo150 H	Uniequip	Martinsried
Wasserbad Typ K2R und NB/S8	Lauda Werke	Königshofen
Zentrifugen:		
• Cytopro™ Cytospin Zentrifuge	Berthold Schlag	Berg. Gladbach
• Labofuge II und Labofuge GL	Haereus	Hanau
• Tischzentrifuge EBA 12	Hettich	Tuttlingen
• Tischzentrifuge Sigma 3E-1	Sigma Laborzentrifugen	Osterode/Harz

2.3 Chemikalien und Biochemikalien

100 bp-Standard	Gibco-BRL	Eggenstein
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth	Karlsruhe
Agarose	Gibco BRL	Eggenstein
Ammoniumpersulfat	Serva	Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma Aldrich	Deisenhofen
Daltroban (BM 13.505; 4-[2-(4Chlorobenzensulfonylamino)-ethyl] benzenacetat)	Roche	Mannheim
DEPC	Sigma Aldrich	Deisenhofen

Desoxynukleosid Triphosphate	Roche	Mannheim
Dexamethason	Sigma Aldrich	Deisenhofen
DMSO	Merck	Darmstadt
DTT	Gibco BRL	Eggenstein
EDTA	Serva	Heidelberg
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich	Deisenhofen
FCS	Roche	Mannheim
Formaldehyd	Appllichem	Darmstadt
Formamid	Merck	Darmstadt
Glykogen	Merck	Darmstadt
HEPES	Roth	Karlsruhe
Indomethacin	Sigma Aldrich	Deisenhofen
Insulin	Sigma Aldrich	Deisenhofen
Lactat	Sigma Aldrich	Deisenhofen
Lipopolysaccharid (E. coli 026:B6)	Sigma Aldrich	Deisenhofen
Medium 199 mit Earle's Salzen ohne NaHCO ₃	Gibco BRL	Eggenstein
Mercaptoethanol	Merck	Darmstadt
Nembutal	Serva	Heidelberg
Noradrenalin (Artherenol)	Sigma Aldrich	Deisenhofen
Oligo-(dT ₁₂₋₁₈)	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
Paraformaldehyd	Serva	Heidelberg
Penicillin	Serva	Heidelberg
Percoll	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
rhIL-1 β rhIL-6 rhTNF α rrIL-6	Strathmann Biotech	Hannover
Streptomycinsulfat	Serva	Heidelberg

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, mit dem Reinheitsgrad "p.a" bezogen.

Rekombinantes Ratten C5a (rrC5a) wurde in der Abt. Immunologie in Göttingen (Leiter: Prof. O. Götze) hergestellt und freundlicherweise für die Versuche der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.4 Verbrauchsmaterialien

Braunülen 1-G16 ("grün"), 2-G14("orange")	Braun Melsungen	Melsungen
Einmal-Injektions-Kanülen	Braun Melsungen	Melsungen
Einmal-Sterilfilter 0,2 und 0,45 µm	Sartorius	Göttingen
Gewebekulturschalen 35 mm	Nunc	Wiesbaden
HistoBond™ Objektträger für Cytospin	Bertold Schlag	Berg. Gladbach
Nylonnetz "Scrynel NY 79 HD"	Züricher Beuteltuchfabrik	Zürich, Schweiz
Polypropylenröhrchen, steril, 15 ml, 50 ml	Greiner	Nürtingen
Reaktionsgefäße 0,2 ml und 1,5 ml	Greiner	Nürtingen
Spritzen 1 ml, 5 ml	Braun Melsungen	Melsungen

2.5 Reinigungs- und Nachweissysteme ("Kits")

Granutest®	Merck	Darmstadt
Rneasy® Total RNA Kit	Qiagen	Hilden
Qiagen® Rnase-free DNase Set	Qiagen	Hilden
QiaEx®II Agarose Gel Extraction Kit	Qiagen	Hilden

2.6 Enzyme

“DAp-GoldStar“ DNA-Polymerase	Eurogentec	Seraing, Belgien
Dnase I, RNase-frei (EC 3.1.21.1) Qiagen® RNase-free DNase Set	Qiagen	Hilden
Glucose-Dehydrogenase (EC 1.1.1.47) Granutest®	Merck	Darmstadt
Mutarotase (EC 5.1.3.3) Granutest®	Merck	Darmstadt
SuperScript™ II Rnase H ⁻ Reverse Transcriptase aus E.coli	Gibco BRL	Eggenstein

2.7 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden in Auftragssynthese von der Firma IBA GmbH, Göttingen, bezogen.

Name	Sequence (5'→3')	GenBank Acc. No.	Position
C5a-R-F	GGT GGC CGA CCT CCT CTC GTC	Y09613	267-287
C5a-R-R	GAC CAC CGC CAT CAC CAC TTT G		777-756
β-actin-F	GAT ATC GCT GCG CTC GTC GTC	V01217	1253-1273
β-actin-R	CCT CGG GGC ATC GGA ACC		2572-2555

F= forward; R= reverse

2.8 Antikörper

R63 (anti-Ratten C5aR-mAb)	Abt.Immunologie,Georg-August- Universität	Göttingen
MOPC-21 (IgG1-Isotyp-Kontrolle)	Sigma Aldrich	Heidelberg
Kaninchen-anti-Maus IgG1, FITC-gekoppelt	Dianova	Hamburg

3. METHODEN

3.1 Tierexperimentelle Methoden: *in vivo* Modelle

Für die *in vivo* Experimente wurden aus Kostengründen kleinere (120 -180 g) Tiere verwendet. Die verschiedenen Substanzen wurden intraperitoneal in einem Gesamtvolumen von 500 µl gespritzt. Als Trägermaterial wurde 0,1% RSA in 0,9% NaCl benutzt, um eine eventuelle Anheftung der Stimuli an die Wände der Reaktionsgefäße und der Spritzen zu vermeiden. Die Injektionen erfolgten den Experimenten entsprechend in der Nacht vor der Zellpräparation oder am Versuchstag nach folgendem Schema:

	<u>Stimuli</u>	<u>Lösungsmittel</u>
Kontrollratten	---	0,1% RSA in 0,9% NaCl
IL-6-behandelte Ratten	0,02 µg rhIL-6 / g Körpergewicht	0,1% RSA in 0,9% NaCl
LPS-behandelte Ratten	2,5 µg LPS / g Körpergewicht	0,1% RSA in 0,9% NaCl

3.2 Isolierte Leberperfusion

Mit Hilfe der isolierten Leberperfusion wurden die metabolischen und hämodynamischen Veränderungen in der Leber nach C5a- und Noradrenalin-Stimulation in Abwesenheit oder Gegenwart des Prostanoidsynthese-Inhibitors Indomethacin und des Thromboxan A₂-Rezeptor-Antagonisten Daltroban analysiert. Die Perfusionen wurden mit Kontrollratten, sowie mit IL-6- und LPS-behandelten Tieren durchgeführt.

Lösungen

Nembutal

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

Krebs-Ringer-Perfusionsmedium (Ca²⁺-haltig)

NaCl	122,0 mM	7,13 g/l
KCl	4,7 mM	0,350 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,5 mM	0,368 g/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mM	0,163 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mM	0,296 g/l
NaHCO ₃	24,0 mM	2,016 g/l
Streptomycin	0,16 mM	0,117 g/l

Um die Bildung eines $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Niederschlags zu vermeiden, wurde CaCl_2 getrennt von den anderen Substanzen gelöst. Der Puffer wurde am Tag vor der Perfusion angesetzt, mit Carbogen äquillibriert und bei 4°C gelagert.

Am Perfusionstag wurden die folgenden Substanzen zugegeben:

Glucose	5,0 mM	0,990 g/l
Lactat	4,5 mM	0,846 g/l
Pyruvat	0,2 mM	0,022 g/l

Die Lösung wurde auf 37°C erwärmt, nochmals mit Carbogen äquillibriert und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Inhibitoren

Der Cyclooxygenase-Inhibitor Indomethacin und der Thromboxan A_2 -Rezeptor-Antagonist Daltroban wurden in einer Konzentration von je 20 mM in DMSO gelöst und - wie angegeben - dem Perfusionsmedium zu einer Endkonzentration von 20 μM ($\cong 0,1\%$ DMSO) beigegeben.

Stimuli

Rekombinantes Ratten-C5a (rrC5a)

Das in der Abteilung für Immunologie hergestellte, HPLC-gereinigte rrC5a wurde aliquotiert und in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS bei -20°C gelagert. Die Endkonzentration des in den Perfusionsexperimenten infundierten rrC5a betrug 1 $\mu\text{g/ml}$.

Noradrenalin (NA)

Aufgrund ihrer hohen Instabilität wurde die Noradrenalinlösung am Anfang jeder Perfusion frisch angesetzt und auf Eis aufbewahrt. Die Endkonzentration des infundierten Noradrenalin betrug 1 μM .

Durchführung

Alle Perfusionsversuche wurden in den ersten Stunden der Hellphase (8-13 h morgens) durchgeführt. Die Ratten wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Nembutal (60 mg/kg) narkotisiert. Nach erfolgter Narkose wurde die Bauchhöhle mit einem Längsschnitt eröffnet. Der Magen-Darm-Trakt wurde zur rechten Körperseite verlagert und eine offene Ligatur um die *Vena portae* gelegt (Abb.4). Die *Vena portae* wurde mit einer "grünen" Braunüle (1,3 x 45 mm) kanüliert, das Perfusionsmedium angeschlossen und die *Vena ca-*

va inferior caudal in möglichst großem Abstand zur Leber mit einem einzigen Schnitt eröffnet. Das auf 37°C vorgewärmte Medium wurde aus dem Vorratsgefäß durch den ebenfalls vorgewärmten Oxygenator (eine Modifizierung des Kugelkühlers, mit zusätzlichen Vorrichtungen zum Begasen und Überlauf) gepumpt; hier wurde die Lösung während der Perfusion ständig begast. Der normale Blutdruck in der *Vena portae* beträgt bei der Ratte 8-14 mm Hg, bzw. 1,1-1,9 kPa (Stümpel, persönliche Mitteilung). Um die verminderte Sauerstoffkapazität des erythrocytenfreien Perfusionsmediums zu kompensieren, wurden die Rattenlebern mit unphysiologisch hohen Flußraten perfundiert (ca. 50 cm Wassersäule, was 37 mm Hg oder 4,9 kPa entspricht). Der gewünschte Perfusionsdruck wurde durch die Höhe des Oxygenators über dem Perfusionsplatz bestimmt. Das Medium wurde durch eine gläserne Blasenfalle geleitet und erreichte über die fixierte Kunststoffbraunüle die Leber.

Die Leber wurde in wenigen Sekunden mit einer Flußrate von 40 ml/min blutfrei gespült. Die Braunüle wurde mit der Ligatur fixiert. Anschließend wurde der Brustkorb unter Durchtrennung des Zwerchfells eröffnet und die *Vena cava inferior* cranial der Leber abgebunden. Zum Schluss wurde die *Vena cava inferior* mit einer "orangen" Braunüle (22 x 50 mm) kanüliert und mit Hilfe einer Ligatur fixiert. Über diese zweite Braunüle konnte das Eluat in einem Fraktionssammler aufgefangen werden.

Die Leber wurde nicht rezirkulierend unter konstantem Druck (ca. 50 cm Wassersäule) perfundiert. Die Flußrate wurde auf 4 ml / (min * g Leber) eingestellt (Lebergewicht der Ratte: ca. 4% des Körpergewichts). Nach einer Äquilibrierungsphase von 15 min begann die eigentliche Perfusion. Nach einer 10-minütigen Vorperfusionsphase wurden die Stimuli für jeweils 30 s mittels eines Perfusors mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/min in den zur Leber führenden Schlauch infundiert.

Probenentnahme zur Bestimmung von Metaboliten und Flußrate

An die in der *Vena cava inferior* caudal der Leber befestigte Braunüle wurde ein abführender Schlauch angeschlossen (Abb.6). Daraus wurde mittels einer Spritze jede Minute eine Probe von 1 ml entnommen, in ein E-cup überführt und bis zum Ende der Perfusion auf Eis aufbewahrt. Die Metabolitenbestimmung wurde direkt nach der Perfusion durchgeführt oder die Proben wurden bis zur Bearbeitung bei -20°C gelagert.

Die Flußraten wurden durch Wiegen der im Minutentakt mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangenen Flüssigkeitsmengen bestimmt.

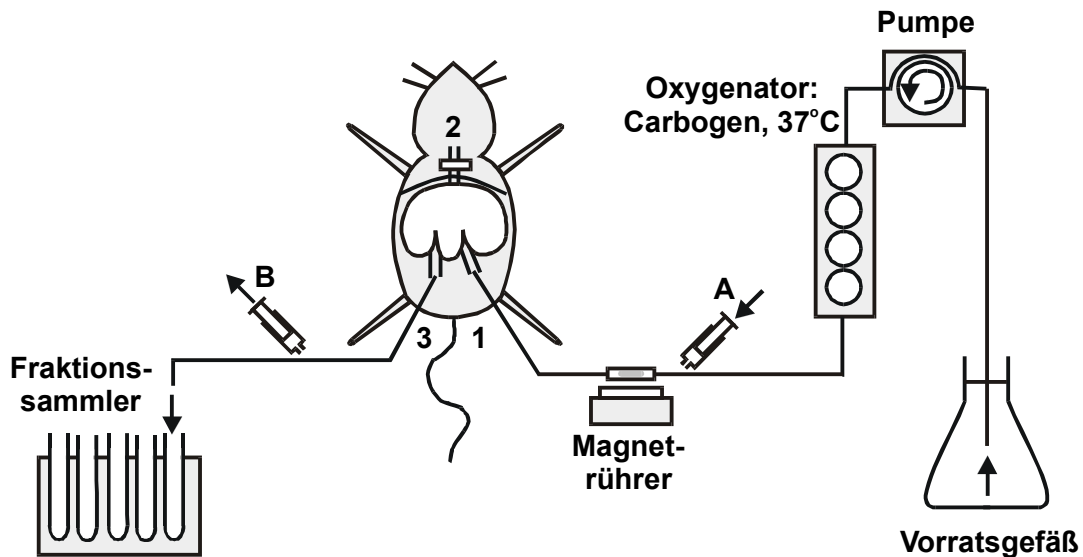


Abb. 6: Aufbau der Perfusioneinheit. Medium (37°C) wurde aus dem Vorratsgefäß zum Oxygenator gepumpt und dort mit Carbogen angereichert. Vor der Leber konnten mit Hilfe eines Perfusors Signalsubstanzen infundiert werden (A); caudal der Leber wurden Proben zur Metabolitenbestimmung entnommen (B), bevor das Effluat zur Bestimmung der Flußraten im Fraktionssammler aufgefangen wurde. (1) *Vena portae*: Zufluß über Braunüle, (2) *Vena cava inferior*, cranial der Leber ligiert, (3) *Vena cava inferior*: Abfluß über Braunüle (nach Pestel, Doktorarbeit)

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung von Hepatocytan (nach Meredith, 1988)

Lösungen für die Isolierung und Medium zum Kultivieren von Hepatocytan

10 x Stammlösung

NaCl	1400 mM	81,820 g/l
KCl	50 mM	3,728 g/l
MgCl ₂ x 6H ₂ O	8 mM	1,626 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	16 mM	2,848 g/l
KH ₂ PO ₄	4 mM	0,544 g/l
		pH 7,4

Waschpuffer

Stammlösung (10x)	1x	0,100 l/l
CaCl ₂	1,0 mM	0,147 g/l
Osmolarität		280-300 mOsmol
		pH 7,4

Perfusionspuffer

Stammlösung	1x	0,100 l/l
NaHCO ₃	25,0 mM	2,100 g/l
EDTA	2,0 mM	0,745 g/l
D-Glucose	15,0 mM	2,973 g/l
Lactat	2,0 mM	0,846 g/l
Na-Pyruvat	0,2 mM	0,022 g/l
Osmolarität		280-300 mOsmol pH 7,4

Die Lösungen wurden mit Quarzwasser angesetzt und mit Carbogen (95% O₂ / 5% CO₂) äquilibriert. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Die Osmolarität des Perfusions- und Waschpuffers wurde kontrolliert und ggf. mit Quarzwasser oder NaCl auf 280-300 mOsmol eingestellt. Anschließend wurden die Puffer sterilfiltriert (Porengröße des Filters: 0,2 µm) und bei 4°C aufbewahrt.

Nicht-rezirkulierende Perfusion der Rattenleber

Männliche Wistar-Ratten (120-250 g) wurden durch intraperitoneale Injektion von 60 mg/ kg Körpergewicht Nembutal narkotisiert. Das Abdomen wurde entlang der *Linea alba* eröffnet. Um die *Vena portae* cranial der *Vena lienalis* wurde eine offene Ligatur gelegt. Zunächst wurde die *Vena portae* mit einer "grünen" Kunststoffbraunüle (1,3 x 45 mm) kanüliert und mit auf 37°C temperiertem Perfusionsmedium nach Eröffnung der *Vena cava inferior* caudal der Leber blutfrei gespült (s. 3.2). Die nicht-rezirkulierende Leberperfusion mit 2 l Ca²⁺-freier, -haltiger Krebs-Ringer Lösung zur Auflösung des Zellverbandes erfolgte unter konstantem Druck (ca. 50 cm Wassersäule) und einer Flußrate von 40 ml/ min innerhalb von 45 min.

Herstellung der Zellsuspension und Reinigung der Hepatocyten durch Dichtegradientenzentrifugation

Am Ende der Perfusionszeit wurde die Leber aus dem Abdomen freipräpariert und in Waschpuffer bei Raumtemperatur überführt. Die Leberkapsel wurde eröffnet und die Zellen innerhalb von 5-10 min aus den Leberlappen herausgelöst. Die noch vorhandenen Zellaggregate, Bindegewebs- und Kapselbestandteile konnten durch ein Gazesieb (Porengröße: 60 µm) abgetrennt werden. Das Filtrat wurde auf 2 Corex-Röhrchen mit je 100 ml Waschpuffer verteilt und durch zweimalige Zentrifugation bei 20 x g (300 rpm) in der Heraeus-Labofuge für jeweils 2 min von Nichtparenchymzellen und Zelltrümmer getrennt. Das Sediment wurde

in insgesamt 33 ml Waschpuffer resuspendiert. Um den 52% (v/v) Percoll-Gradienten vorzubereiten, wurden 43,1 ml Percoll mit 6,5 ml Stammlösung verdünnt, zur Zellsuspension gegeben und die Suspension auf 2 sterile 50 ml Polypropylenröhrchen verteilt. Nach Zentrifugation in der Sigma 3E-1 Zentrifuge bei $800 \times g$ (2800 rpm) für 5 min wurden die Zelltrümmer und Nichtparenchymzellen im Überstand entfernt. Das Sediment, das die gereinigten vitalen Hepatocyten enthielt, wurde in Waschpuffer aufgenommen und nochmal bei $20 \times g$ (300 rpm) für 2 min in vorher gewogenen Röhrchen gewaschen. Nach der Zentrifugation wurde der Waschpuffer gründlich abgesaugt, das Hepatocytensediment gewogen und in M199/ 0,5 nM Insulin/ 100 nM Dexamethason/ 1% Antibiotika zu einer Endkonzentration von 1 g Zellen/ 100 ml Medium aufgenommen. Dies entspricht ca. 1×10^6 Zellen pro ml.

Die Reinheit der Hepatocytensuspension wurde lichtmikroskopisch bestimmt und betrug ca. 98 %.

3.3.2 Versuche mit frisch isolierten Hepatocyten

Frisch isolierte Hepatocyten aus LPS- und IL-6 behandelten Ratten sowie aus Kontrolltieren wurden zur Analyse der mRNA-Expression (s. 3.4.1) in Lysis-Puffer (RNeasy® Total RNA Kit, Qiagen, Hilden) aufgeschlossen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Zur Analyse der Protein-Expression mittels Durchflußcytometrie und Immuncytochemie (s. 3.6) wurden die Zellen in PBS aufgenommen und sedimentiert; die Aufarbeitung erfolgte direkt im Anschluß. Für die Versuche zur Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase wurden die Zellen bis zum Start des Experiments in HEPES-gepufferter Krebs-Ringer-Lösung mit 20 mM Glucose in einer Schale auf Eis gerührt.

Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase in frisch isolierten Hepatocyten

Lösungen

HEPES-gepufferte Krebs-Ringer-Lösung

HEPES	20 mM	2,358 g
Krebs-Ringer-Lösung (s.3.2)		ad 500 ml
		pH 7,4

Die Lösung wurde mit Streptomycin-freier Krebs-Ringer-Lösung angesetzt, nach der pH-Einstellung sterilfiltriert (20 µm Sterilfilter) und bei 4°C gelagert.

Die Experimente zur Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase in frisch isolierten Hepatocyten erfolgten direkt nach der Präparation. Bis zum eigentlichen Versuch nach maximal 1 h wurden die Hepatocyten in HEPES-gepufferter Krebs-Ringer-Lösung mit 20 mM Glucose auf Eis gerührt. Die frische Hepatocytensuspension (s. 3.3.1) wurde a 1 ml ($\cong 1 \cdot 10^6$ Zellen) in E-cups überführt und für 2 min bei 50 x g (650 rpm) in der Tischzentrifuge EBA 12 (Hettich, Tuttlingen) sedimentiert. Die Zellen wurden 1 x mit HEPES-gepufferter Krebs-Ringer-Lösung gewaschen und anschließend für 15 min in 300 μ l der gleichen Lösung in Gegenwart oder Abwesenheit des Prostanoidsynthese-Inhibitors Indomethacin (20 μ M) bei 37°C unter leichtem Schwenken im Thermomixer inkubiert. Die Stimuli gelöst in je 100 μ l Krebs-Ringer-Lösung wurden im 10 s -Takt in Endkonzentration von 1 μ g/ml rrC5a bzw. 1 μ M Noradrenalin zu den Zellsuspensionen gegeben. Nach genau 2 min wurden die Proben - wieder im 10 s-Takt - in flüssigen Stickstoff eingefroren. Das Zellhomogenat wurde bei -20°C bis zur weiterer Bearbeitung (s. 3.5.1) aufbewahrt.

3.3.3 Primärkultur von Rattenhepatocyten

Herstellung Collagen-beschichteter Zellkulturschalen

Rattenschwänze von jungen (bis 200 g), nicht behandelten Ratten wurden gesammelt und bei -20°C gelagert. 20 Schwänze wurden in 70% Ethanol gereinigt, die Haut wurde abgezogen und die Collagenfasern mit einer Zange durch Herausbrechen der Wirbel aus dem Bindegewebe gezogen. Die Fasern wurden 4 h bei RT getrocknet, in ca. 2 cm lange Stücke geschnitten, wobei die blutigen Stellen sorgfältig entfernt wurden, und über Nacht auf Aluminiumfolie unter UV-Licht sterilisiert.

Zu 0,5 g sterilen Fasern wurden 200 ml 0,05% Essigsäure gegeben, die Suspension mindestens 24 h bei 4°C gerührt und anschließend in 50 ml Polypropylenröhrchen in der Sigma 3E-1 Zentrifuge bei 2500 x g (5000 rpm) für 1 h zentrifugiert. Der zähflüssige Überstand wurde in sterile Flaschen überführt und für maximal 1 Jahr bei 4°C gelagert.

In Zellkulturschalen (\varnothing 35 mm) wurde 1 ml Collagenlösung pipettiert und gleichmäßig verteilt. Ca. 900 μ l wurden wieder abgenommen und die geöffneten Platten über Nacht unter der Sterilbank getrocknet. Die collagenierten Platten wurden bis zu 2 Wochen bei Raumtemperatur gelagert.

Kultivierung von primären Rattenhepatocyten

Lösungen

Antibiotika-Stammlösung

Penicilin, Natrium-Salz	16,91 mM	0,63 g
Streptomycinsulfat	13,72 mM	1,00 g
NaCl 0,9%		ad 100 ml

HC-Kulturmedium

Insulin-Stammlösung (10^{-5} M)	5×10^{-10} M	5 μ l
Dexamethason-Stammlösung (10^{-4})*	10^{-7} M	0,1 ml
Antibiotika- Stammlösung	1% (v/v)	1 ml
M199		ad 100 ml

Die isolierten Rattenhepatocyten wurden auf collagenierten Zellkulturschalen (\varnothing 35 mm) plattiert: 1 ml Hepatocytenmedium wurde auf der Platte vorgelegt und mit wurde 1 ml Hepatocytensuspension ($\cong 1 \cdot 10^6$ Zellen, s.o.) versetzt. Nach einer Anheftungsphase von 3,5 - 4 h erfolgte ein Mediumwechsel; hierbei wurden nicht adherierte oder vorgeschädigte Zellen entfernt.

Bis zum Versuchsbeginn wurde das Medium täglich gewechselt (1 ml pro \varnothing 35 mm Kulturschale). Die Inkubation der Hepatocyten erfolgte im Begasungsbrutschrank bei 37°C und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 16% O₂, 5% CO₂ und 79% N₂.

3.3.4 Versuche mit kultivierten Hepatocyten

Die kultivierten Hepatocyten wurden direkt nach dem ersten Mediumwechsel - also nach 4 h - oder nach 24 h in 1 ml frisches HC-Kulturmedium (M199/ 0,5 nM Insulin/ 100 nM Dexamethason/ 1% Antibiotika) umgesetzt und für die angegebenen Zeiträume mit verschiedenen Substanzen laut Tabelle stimuliert:

	<u>Endkonzentration des Stimulus*</u>
unstimuliert	/
LPS	100 ng/ml
rhIL-1 β	10 ng/ml
rhIL-6	100 ng/ml
rhTNF α	100 ng/ml

* Die Stimuli wurden in HC-Medium (M199/ 0,5 nM Insulin/ 100 nM Dexamethason/ 1% Antibiotika) vorverdünnt und in einem Gesamtvolumen von 20 µl zur angegebenen Endkonzentration auf die Platten pipettiert.

Für eine Stimulation über 48 h wurde das Medium nach 24 h durch frisches, Stimulus-haltiges medium ersetzt. Zur Untersuchung der mRNA-Expression wurden die Kulturschalen auf Eis gelegt, die Hepatocyten mit steriler 0,9% NaCl gewaschen, mit Lysis Puffer (RNeasy® Total RNA Kit, Qiagen, Hilden) und 1% Mercaptoethanol versetzt und mit einem Gummischaber abgekratzt. Lysate von jeweils 2 Platten wurden gepoolt und bis zur RNA-Isolierung (s. 3.4.1) bei -20°C aufbewahrt.

Zur Untersuchung der Protein-Expression wurden die Hepatocyten auf Eis abgelöst. Hierzu wurde das Medium vollständig abgesaugt, die Zellen 3 x mit jeweils 1 ml PBS gewaschen und anschließend in PBS/EDTA (s. 3.6.2) auf Eis inkubiert. Die Ablösung erfolgte durch vorsichtiges Pipettieren ggf. unter Einsatz eines Gummizellschabers. Die Analyse der Protein-Expression mittels Durchflußcytometrie oder Immunocytochemie wurde direkt im Anschluß durchgeführt.

Aktivierung der Glycogen-Phosphorylase in kultivierten Hepatocyten

Die Versuche zur Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase erfolgten auf einer vorgeheizten Wärmeplatte (37°C) oder in einem klimatisierten 37°C-Raum.

Die primären Hepatocyten wurden auf Ø 35 mm-Kulturschalen für 24 h kultiviert und für weitere 24 h wie oben beschrieben mit LPS, rhIL-1 β , rhIL-6 und rhTNF α stimuliert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 3 x mit 1 ml HEPES-gepufferter Krebs-Ringer-Lösung gewaschen und für 15 min in 1 ml der gleichen Lösung in Anwesenheit des Prostanoidsynthese-Inhibitors Indomethacin vorinkubiert. Die Lösung wurde dann im 10 s-Takt durch 350 µl Krebs-Ringer-Lösung (3.3.2), die die jeweiligen Stimuli in Endkonzentration von 1 µg/ml rrC5a bzw. 1µM Noradrenalin enthielt, ersetzt. Nach genau 2 min wurde die Lösung abgesaugt, die Platten sofort in flüssigen Stickstoff getaucht und danach bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus frischen und kultivierten Hepatocyten

Lösungen und Enzyme

DEPC-Wasser

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	0,1% (v/v)	1 ml/l
----------------------------	------------	--------

Bidestilliertes Wasser wurde mit 0,1% (v/v) DEPC versetzt, um im Wasser vorhandene RNAsen zu inaktivieren. Die Inkubation über Nacht erfolgte wegen der hohen Toxizität von DEPC unter dem Abzug. Anschließend wurde der Ansatz zur Inaktivierung der DEPC-Reste autoklaviert. Alle Lösungen für die Isolierung und weitere Manipulationen von RNA wurden ausschließlich mit DEPC-Wasser angesetzt, um die Wirkung exogener RNAsen zu vermeiden.

Reverse Transkriptase

Superscript™ RNase H ⁻ Reverse Transkriptase (200 U/μl)	200 U/Ansatz
--	--------------

Die Reverse Transkriptase wurde von Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein) geliefert und bei -20°C gelagert.

DTT

Dithiothreitol	0,1 M	0,154 g/l
----------------	-------	-----------

Die Lösung war der Reversen Transkriptase beigefügt und wurde bei -20°C gelagert.

“First Strand“ Puffer (5x RT-Puffer, pH 8,3)

Tris/HCl	250 mM	30,275 g/l
KCl	375 mM	27,960 g/l
MgCl ₂	15 mM	3,050 g/l

Die Lösung war der Reversen Transkriptase beigefügt und wurde bei -20°C gelagert.

dNTP-Mix

dATP (10 mM)	1 mM	10 µl
dCTP (10 mM)	1 mM	10 µl
dGTP (10 mM)	1 mM	10 µl
dTTP (10 mM)	1 mM	10 µl
DEPC-Wasser		60 µl

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

Die frisch isolierten Hepatocyten wurden nach dem Percoll-Gradienten (vgl. 3.3.1) in Waschpuffer aufgenommen, a 1 ml ($\cong 1 \times 10^6$ Zellen) in E-cups verteilt und für 2 min bei 50 x g (650 rpm) in der Tischzentrifuge EBA 12 sedimentiert. Der Waschpuffer wurde vollständig abgesaugt und das Pellet in 350 µl Lysispuffer (RNeasy total RNA Kit, Qiagen, Hilden) mit 1% Mercaptoethanol aufgenommen. Die kultivierten Zellen wurden mit steriler 0,9% NaCl gewaschen und anschließend auf Eis mit einem Gummischaber abgekratzt. Lysate von jeweils 2 E-cups bzw. 2 Platten (je in 350 µl Lysispuffer) wurden gepoolt. Die Zellysate wurden bis zur RNA-Isolierung bei -20°C aufbewahrt.

Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) gereinigt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Adhäsion von RNA-Fragmenten mit mehr als 200 Basen an Silica-Gel-Membranen in Säulen. Zurnächst wurden die Proben unter stark denaturierenden Bedingungen in einem Guanidiniumisothiocyanat- und β -Mercaptoethanol-haltigen Aufschlußpuffer lysiert, der gleichzeitig die RNasen inaktiviert. Nach dem Auftauen wurden die Lysaten auf die QIAshredder-Säulen gegeben und durch 2 minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (23930 x g, 14000 rpm) homogenisiert, wodurch grobe Verunreinigungen und Proteine entfernt und die Viskosität der Lysate reduziert wurden. Um optimale Bindungsbedingungen zu schaffen, wurden die Filtrate mit dem gleichen Volumen (700 µl) 70% Ethanol durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und dann auf die RNeasy-Säulen gegeben. Der Durchfluß wurde verworfen und die adherierte RNA nach einem Waschschrift mit dem Qiagen® RNase-free DNase Set (Qiagen, Hilden) behandelt. Hierzu wurden die Membranen mit den immobilisierten Proben 15 min mit RNase-freier DNase I laut Vorschrift des Herstellers inkubiert. (Bei der Vorbereitung der Lösung und Arbeit mit DNase I ist zu beachten, daß dieses Enzym besonders empfindlich gegenüber physikalischer Denaturierung ist, deshalb darf die direkt vor dem Gebrauch vorbereitete Lösung nur durch leichtes Schwenken homogenisiert werden.) Es folgten 3 weiteren Waschschriften mit anschließender Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (23930 x g, 14000 rpm) zum vollständigen Entfernen der Waschlösungen. Zur Elution der gereinigten RNA wurden je 30 µl DEPC-Wasser auf die

Säulen gegeben, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann die RNA durch Zentrifugation bei 8000 x g (8220 rpm) von den Säulen eluiert.

Die Konzentration und Reinheit der RNA-Proben wurden spektrophotometrisch bestimmt:

Konzentration: RNA [$\mu\text{g/ml}$] = ΔE_{260} * Verdünnungsfaktor * 40

Reinheit: 260 nm/ 280 nm Quotient > 1,5*

wobei: 260 nm = Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren

280 nm = Absorptionsmaximum von Proteinen

* Als Standard für die Reinheit von RNA gilt ein Quotient von 1,7- 2. Hier kann aber das für den DNase-Verdau benutzte Enzym nicht vollständig entfernt werden; dies resultiert in einer Senkung des Quotienten.

3.4.2 Reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) ist eine hochsensible Methode, mit der die Genexpression auf der Stufe der RNA untersucht werden kann. Zur reversen Transkription von mRNA werden Oligonukleotide (Oligo (dT)₁₂₋₁₈) als Startermoleküle an den poly-(A)-Schwanz am 3'-Ende der RNA-Matrizen hybridisiert. Danach wird mittels einer retroviralen RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) eine komplementäre DNA-Kette (cDNA) hergestellt. Bei der anschließend durchgeführten Polymerase Kettenreaktion wird mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*) die neu synthetisierte cDNA amplifiziert. Die Produkte werden im Agarosegel elektrophoretisch nach ihrer Größe getrennt und nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht visualisiert.

cDNA - Synthese (Reverse Transkription)

Isolierte Gesamt-RNA aus Hepatocyten von 2 Zellkulturplatten (\varnothing 35 mm) (s. 3.3.4) bzw. 2 E-cups (s. 3.3.2) wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 11 μl DEPC-Wasser aufgenommen. Der Ansatz wurde mit 1 μl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 $\mu\text{g/ml}$) versetzt, zur Denaturierung der Sekundärstruktur der RNA 10 min bei 68°C im Thermomixer inkubiert und anschließend sofort für 10 min in Eis gestellt. Zu diesem Ansatz wurden 4 μl "First Strand" Puffer (5x), 2 μl 0,1 M DTT und 1 μl dNTP-Mix pipettiert, das Gemisch 2 min auf 37°C er-

wärmt und danach mit 1 µl (200 U) "Superscript™ II RT" (reverse Transkriptase) versetzt. Die reverse Transkription wurde im Thermocycler nach folgendem Schema durchgeführt:

90 min 45°C	cDNA-Synthese
30 min 52°C	
15 min 95°C	Denaturierung der reversen Transkriptase

und der Ansatz anschließend bei -20°C gelagert.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction) ist eine schnelle Methode, *in vitro* beliebige DNA-Fragmente enzymatisch zu amplifizieren (Saiki et al., 1989).

Der Reaktionsansatz besteht aus der doppelsträngigen cDNA-Matrize (Template), zwei einzelsträngigen Oligodesoxyribonucleotiden (Primer), die mit dem 5'- bzw. dem 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts hybridisieren, sowie Desoxyribonucleosid-Triphosphate (dNTPs). Weiterhin wird eine wärmebeständige DNA-abhängige DNA Polymerase benötigt, die aus dem thermophilen Mikroorganismus *Thermophilus aquaticus* (Taq-DNA-Polymerase) gewonnen wird. Der Vervielfältigungsprozeß unterliegt drei aufeinanderfolgenden Reaktionen, für die verschiedene Temperaturen nötig sind. Die Temperaturschritte müssen für jeden einzelnen Fall optimiert werden. Die Durchführung erfolgt in einem programmierbaren Thermocycler.

Der Prozeß beginnt mit einer 3-minütigen Denaturierungsphase bei 95°C (initiale Denaturierung). Anschließend erfolgt die zyklische Vervielfältigung der gewünschten Sequenz. Jeder Zyklus beginnt mit der Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei 95°C, wobei die beiden DNA-Strängen voneinander getrennt werden (Denaturierung). Als nächstes erfolgt eine Abkühlung des Reaktionsansatzes auf 45-60°C, um die Hybridisierung der in großem Überschuß vorhandenen Primer mit komplementären DNA-Sequenzen auf den beiden DNA-Ketten zu ermöglichen (Annealing). Von diesen Startermolekülen ausgehend werden nun bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Taq-DNA-Polymerase, an beiden Strängen in 5'→ 3'-Richtung komplementäre DNA-Strängen neu synthetisiert (Extension). Bei jedem weiteren Zyklus dient die bereits vorhandene DNA als Vorlage, so daß es zu einer exponentiellen Vermehrung des gewünschten Fragments kommt. Standardmäßig werden 25-35 Zyklen durchgeführt. Die Länge des PCR-Produkts entspricht dem Abstand der Primer. Die PCR wird durch eine 10-minütige 72°C-Phase beendet, während der die unvollständig verlängerte Ketten ergänzt werden können (finale Extension). (Abb.7)

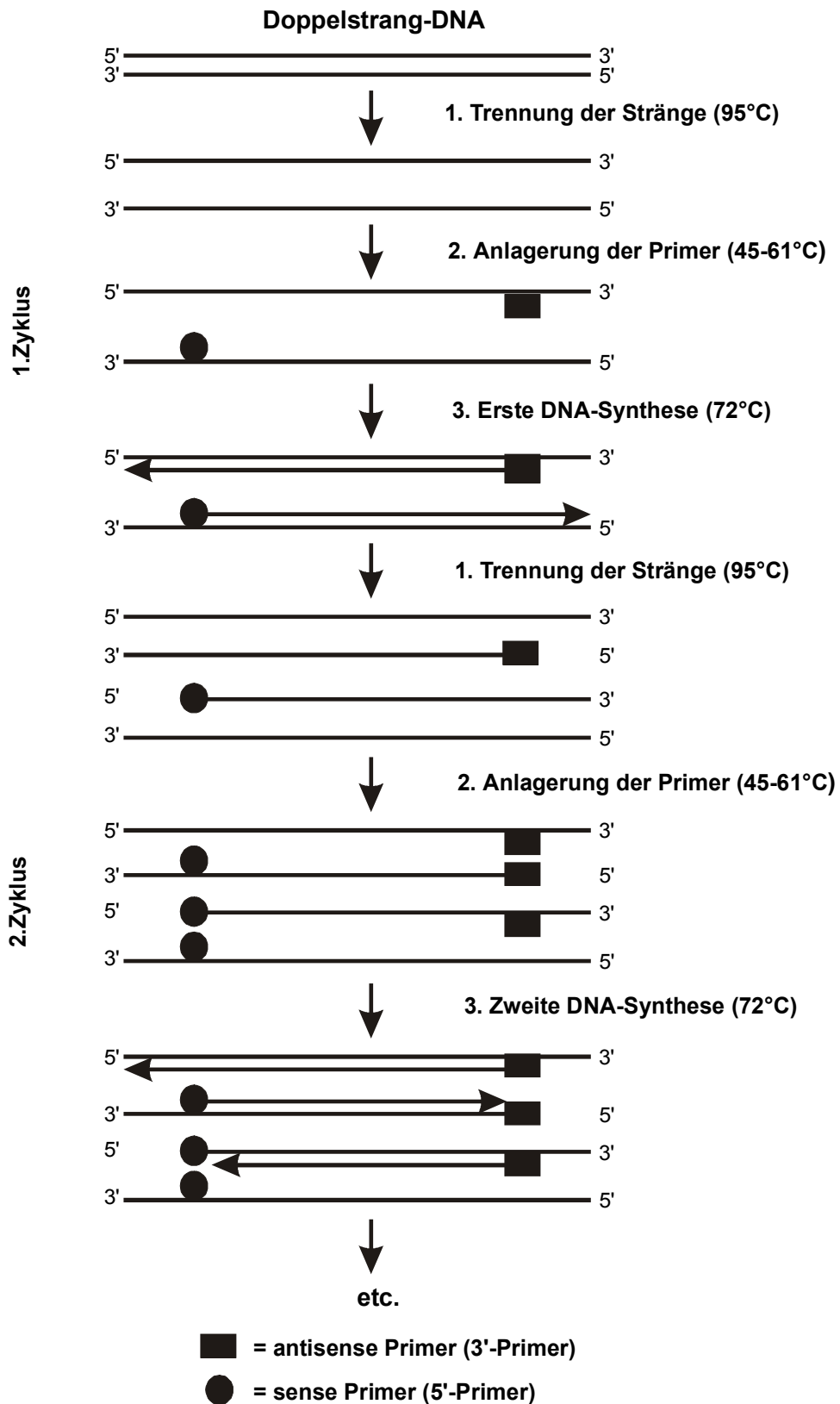


Abb.7: Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion

Lösungen und EnzymeOpti-Puffer (10x Reaktionspuffer)

Die Lösung wurde vom Hersteller (Eurogentec, Belgium) ohne Angabe der Zusammensetzung geliefert.

Verdünnungspuffer für die Dap-Goldstar™ Polymerase

Tris/HCl	20 mM	0,032 g
KCl	100 mM	0,075 g
EDTA 100 mM	0,1 mM	10 µl
DTT 0,1 M	1 mM	0,10 ml
Glycerol	50% (v/v)	5 ml
Nonidet P-40	0,5% (v/v)	0,05 ml
Tween-20	0,5% (v/v)	0,05 ml
DEPC-Wasser		ad 10 ml

Taq-Polymerase

Dap-Goldstar™ Polymerase*	0,25 U/ µl	10 µl
Verdünnungspuffer		150 µl

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

* Die Dap-Goldstar™ Polymerase (Eurogentec, Belgium) besitzt neben der DNA-Polymerase auch 3'→5'-Korrekturleseaktivität, wodurch die Spezifität der cDNA-Amplifikation weiter erhöht wird.

PCR-Protokolle

Mittels RT-PCR wurde die C5a-Rezeptor-Expression auf mRNA-Ebene nachgewiesen und mit der Expression des "housekeeping" Gens β-Actin verglichen.

Für beide Reaktionen wurde jeweils zuerst ein sogenannter Master-Mix angesetzt, der alle notwendigen Komponenten mit Ausnahme des Templates enthielt. Der Mastermix wurde bis zur Templatezugabe auf Eis aufbewahrt.

Master-Mix

Opti-Puffer (10x)	1x	5 µl
DMSO	3% (v/v)	1,5 µl
dNTP-Mix	0,2 mM	1 µl
MgCl ₂	3 mM	3 µl
sense Primer	0,6 µM	0,3 µl
antisense Primer	0,6 µM	0,3 µl
Taq-Polymerase	0,25 U	1 µl
DEPC-Wasser		ad 47 bzw. 49 µl*

* Für die C5aR-PCR wurden 3 µl, für die β -Actin-PCR 1 µl cDNA eingesetzt.

C5a-Rezeptor

3 min	95 °C		35x
1 min	95 °C		
1 min	58 °C		
2 min	72 °C		
10 min	72 °C		

Produktlänge: 511 bp

 β -Actin

3 min	95 °C		35x
1 min	95 °C		
1 min	61 °C		
2 min	72 °C		
10 min	72 °C		

Produktlänge: 769 bp

3.4.3 Trennung und Visualisierung der RT-PCR-Produkte (Gelelektrophorese)

PCR-Produkte lassen sich in Agarose-Gelen entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch auftrennen, wobei die negativ geladene DNA im Spannungsfeld zur Anode wandert. Die DNA im Gel wird durch Interkalation von Ethidiumbromid, das unter UV-Licht blau fluores-

ziert, sichtbar gemacht. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente ist dabei anhand käuflich erwerbbarer Größenstandards zu bestimmen. Für Fragmente < 1 kb ergibt sich eine optimale Trennqualität mit 2%-igen Agarose-Gelen.

Lösungen

Tris-Acetat-EDTA-Lösung (TAE) 50x

Tris	2,5 M	300,5 g
Natriumacetat	1 M	82,0 g
EDTA	0,1 M	37,5 g
H ₂ O bidest		ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7,4 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

Tris-Acetat-EDTA-Lösung (TAE) 1x

TAE 50x		20 ml
H ₂ O bidest		ad 1000 ml

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Agarosegel, 2%

Agarose	2% (w/v)	2g
TAE 1x		100 ml

Auftragungspuffer

Bromphenolblau	0,25% (w/v)	25 mg
Glycerin	40% (v/v)	4 ml
TAE 1x		ad 10 ml

Die Lösung wurde bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromid	1% (w/v)	4g
TAE 1x		400 ml

Die Lösung wurde bei 4°C unter Lichtabschluß gelagert.

Durchführung

2 g Agarose wurden mit 100 ml 1x TAE-Puffer versetzt und in einem Mikrowellengerät durch Erhitzen gelöst. Anschließend wurde die Agaroselösung luftblasenfrei in eine flache Gelform mit senkrecht eingestecktem Kamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde

der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer gelegt, wobei die Flüssigkeit das Gel vollständig bedeckte. 15 µl jeder Probe wurden mit 3 µl (1/5 des Probenvolumens) Auftragungspuffer gründlich gemischt, kurz zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Zur Identifizierung der DNA-Fragmente anhand ihrer Größe wurde eine 100 bp-Leiter als Standard benutzt.

Die Einwanderung der Proben ins Gel erfolgte bei 60-70 V, die eigentliche Trennung für ca. 1,5 h bei 90 V bis die Lauffront, kenntlich gemacht durch den im Auftragungspuffer vorhandenen Farbstoff Bromphenolblau, eine Laufweite von 6-8 cm erreichte.

Anschließend wurde das Gel für 10-30 min in eine Wanne mit Ethidiumbromid gelegt und nach Anfärbung mit einem Videosystem photographiert.

Auswertung

Die Quantifizierung der amplifizierten cDNA erfolgte durch densitometrische Bestimmung der Bandenintensität im Gel. Dies ist ein lediglich semi-quantitatives Verfahren, das jedoch die statistische Auswertung der verschiedenen Versuche ermöglichte.

3.4.4 Sequenzierung der RT-PCR-Produkte

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde nach der "Dye Terminator Cycle Sequencing" Methode nach Herstellervorschrift (Perkin Elmer, Langen) in einem automatischen DNA-Sequenzierungsgerät der Fa. ABI (Modell 373 A) durchgeführt. Bei dieser Methode werden 4 mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen gekoppelte Didesoxynukleotide (ddNTPs, Big Dye Desoxy™ Terminatoren, Perkin Elmer, Langen) mit nicht markierten Desoxynukleotiden gemischt und eine "Sequenzier-PCR" durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird - anders als bei der PCR - nur ein Oligonukleotid-Primer eingesetzt, so dass derselbe Strang immer wieder abgeschrieben wird, bis der Einbau eines der "Big Dye Desoxy™ Terminatoren" einen Strangabbruch bewirkt. Die so entstandenen, am 3'-Ende mit basenspezifischen Farbstoffen markierten Fragmente werden elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch einen 40 mW Argon-Laser (540 nm und 625 nm) werden die vier unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffgruppen angeregt und die Fluoreszenzsignale durch ein Detektorsystem des DNA-Sequenziergerät anhand ihrer unterschiedlichen Emissionswellenlängen identifiziert.

LösungenPremix

Der Ready Reaction Dye Deoxy-Terminator Kit (Perkin-Elmer, Langen) enthält AmpliTaq® DNA-Polymerase FS, Fluoreszenzmarkierte ddNTPs, dNTPs, dITP, Puffer vom Hersteller (ohne Konzentrationsangaben geliefert).

Na-Acetat

Natriumacetat	3 M	246,09 g/l
---------------	-----	------------

Formamid/EDTA

Formamid 99,9% (v/v)	80% (v/v)	8 ml
EDTA 25 mM (pH 8)	5 mM	2 ml
bidest H ₂ O		ad 10 ml

Die Lösung wurde auf pH 8,0 eingestellt, mit einer Spatelspitze Dextranblau versetzt, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung 30% (w/v)

Acrylamid	50 % (w/v)	50 g
Bisacrylamid	2 % (w/v)	2 g
H ₂ O		ad 100 ml

Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) 10x

Tris	0,9 M	108,0 g/l
Borsäure	0,9 M	55,0 g/l
EDTA	25,0 mM	8,3 g/l

Die Lösung wurde auf pH 8,2 eingestellt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Ammoniumpersulfatlösung 10 %

Ammoniumpersulfat	10 % (w/v)	10 g/100 ml
-------------------	------------	-------------

Polyacrylamidgel 4%

30 g Harnstoff wurden mit 8 ml 30 % Acrylamid-Bisacrylamid, 6 ml 10x TBE-Puffer und 24 ml H₂O versetzt und durch Erwärmen bis max. 50°C gelöst. Die Lösung wurde durch einen 0,2 µm Filter gegeben, entgast und direkt nach der Zugabe von 350 µl 10% Ammoniumpersulfatlösung und 20 µl TEMED (Initiation der Polymerisierung) zwischen die vorbereiteten

Glasplatten gegossen. Das Gel (25cm x 48 cm x 0,3 mm) polymerisierte in horizontaler Lage für mindestens 2 h.

Durchführung

Aus frisch isolierten Hepatocyten LPS-behandelter Ratten wurde RNA isoliert, cDNA synthetisiert und mit Sequenz-spezifischen Primern für den C5a-Rezeptor amplifiziert. Zur Sequenzierung wurde das PCR-Produkt nach der elektrophoretischen Trennung im Agarosegel extrahiert, gereinigt und weiter verwendet werden. Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des QIA II™ Extraktions Kit (Qiagen, Hilden): Nach Anfärbung des Agarosegels mit Ethidiumbromid wurden die benötigten Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein zuvor gewogenes E-cup überführt. Hierzu wurde das 3-fache Volumen QX I Puffer sowie 10 µl QX II-Suspension/ 100 mg Gel gegeben. Der Ansatz wurde auf dem Vortex-Mixer homogenisiert und zum Schmelzen der Agarose 10 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden 250 µl Isopropanol zum Ansatz pipettiert und die Probe 1 min bei 10000 x g (9190 rpm) in der Tischzentrifuge EBA 12 zentrifugiert. Nach 2 weiteren Waschschritten - 1 x mit dem QX I-Puffer, 1 x mit Ethanol-haltigem PE-Puffer - wurde der Ansatz mit 30 µl sterilem H₂O 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der klare Überstand enthielt das aus dem Agarosegel extrahierte PCR-Produkt.

Nach der Reinigung aus dem Agarosegel wurde das extrahierte C5aR-PCR-Produkt amplifiziert.

Ansatz

Premix		4 µl
Primer (C5aR-F1)	10 pmol	1 µl
DEPC-H ₂ O		2 µl
C5aR-PCR-Produkt*		3 µl

* Für PCR-Fragmente zwischen 0,2 - 5 kB (C5aR-Produktlänge: 511 bp) werden 10-200 ng DNA benötigt.

PCR-Protokoll für Perkin-Elmer Thermocycler (Model TC2400)

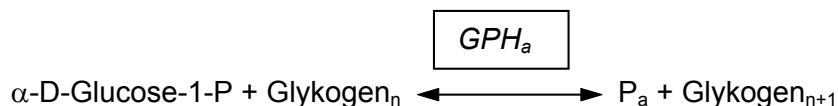
Denaturierung	96°C	10 s	25 x
Anlagerung	55°C	5 s	
Elongation	60°C	4 min	

Im Anschluß an die Amplifikation wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt. Die Proben wurden mit 10 µl 3 M Natriumacetat, 250 µl Ethanol (abs.) und 80 µl H₂O versetzt und 15 min bei 158 000 x g zentrifugiert. Der Waschschrift wurde nach erneuter Zugabe von Ethanol wiederholt und der Niederschlag in der Vacuumzentrifuge getrocknet. Die Probe wurde in 3 µl Formamid/EDTA-Lösung aufgenommen, 2 min bei 90°C denaturiert und in einem 4% Polyacrylamid-Sequenzierringel getrennt. Die elektrophoretische Trennung und die Detektion wurden vom zentralen Servicelabor des Instituts für Biochemie und Molekulare Zellbiologie (Göttingen) durchgeführt.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Enzymatische Bestimmung der Glykogen-Phosphorylase a - Aktivität

Die Glykogenphosphorylase ist das Schlüsselenzym der Glykogenolyse. Aufgrund der hohen intrazellulären Phosphatkonzentration und der niedrigen Glucose -1- Phosphatkonzentration katalysiert die Glykogen-Phosphorylase a (die aktive phosphorylierte Form des Enzyms) *in vivo* den Glykogen-Abbau. Dabei wird das Reaktionsgleichgewicht bei einem P_a / G-1-P Verhältnis von 3,6 erreicht. *In vitro* wird diese reversible Reaktion durch Verschiebung des Gleichgewichts (P_a / G-1-P =1) in Richtung Glykogen-Synthese verschoben.



P = Phosphat

P_a = anorganisches Phosphat

n = Anzahl der Glucosereste im Glykogen

Das Reaktionsprodukt ist anorganisches Phosphat, das in saurer Lösung mit Ammoniummolybdat zu Ammoniummolybdatophosphat reagiert. Durch Zugabe eines Reduktionsmittels erhält man eine tiefblaue Lösung 5- und 6-wertiger Molybdän-Mischoxide, deren Farbintensität bei 650 nm colorimetrisch bestimmt werden kann.

LösungenAufschlußpuffer

NaF	100 mM	4,20 g/l
EDTA	20 mM	7,45 g/l
Glycylglycin	50 mM	6,60 g/l
Glykogen	0,5% (w/v)	5,00 g/l
		pH 7,4

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für Zellsuspensionen wurde den Puffer 2x konzentriert angesetzt (2x Aufschlußpuffer).

Testlösung

Glucose - 1 - Phosphat	100 mM	37,60 g/l
NAF	300 mM	12,60 g/l
Coffein	1 mM	0,19 g/l
Glykogen	2% (w/v)	20,00 g/l

Der pH-Wert wurde auf 6,4 eingestellt. Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.

Phosphatreagenz

Ammoniummolybdat x 7 H ₂ O	2 mM	2,5 g/l
H ₂ SO ₄	0,26 M	14 ml/l

Ammoniummolybdat wurde in 50 ml H₂O gelöst, H₂SO₄ mit 500 ml H₂O verdünnt. Die beiden Lösungen wurden gemischt und mit H₂O bidest auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Reduktor

1-Amino-2-Naphtol-Sulfonsäure	20 mg
NaHSO ₄	120 mg
Na ₂ SO ₃	120 mg

Die Substanzen wurden gemörsert, gemischt und bei Raumtemperatur in einem Lichtundurchlässigen Röhrchen gelagert. Direkt vor Gebrauch wurden 25 mg der Mischung mit 1 ml H₂O bidest versetzt und auf dem Vortex-Mixer gelöst.

Durchführung

Zellysis und Glykogenolyse

Nach der Durchführung der Versuche zur Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase (s. 3.3.2; 3.3.4) wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt. Zu weiterer Bearbeitungen wurden die Proben mit $400\ \mu\text{l}$ Aufschlußpuffer (2fach konzentriert) versetzt und unter leichtem Schwenken aufgetaut; die kultivierten Hepatocyten wurden im $400\ \mu\text{l}$ Aufschlußpuffer auf Eis abgekratzt. Anschließend wurden die Zellen durch Beschallen homogenisiert. Zu je $100\ \mu\text{l}$ Zellysate wurden im 10 s-Takt Probe $100\ \mu\text{l}$ glykogenhaltige Testlösung gegeben, die Ansätze wurden auf dem Vortex-Mixer gemischt und genau 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Reaktionen wurden durch Zugabe von $100\ \mu\text{l}$ 20% Trichloressigsäure gestoppt (Denaturierung der Enzyme) und nach 10 min Ruhezeit auf Eis bei $2500 \times g$ (5000 rpm, Sigma E-2 Zentrifuge, 4°C) 10 min zentrifugiert. Zur Bestimmung der basalen Glykogenolyse wurde eine Probe gleichzeitig mit Testlösung und 20% Trichloressigsäure versetzt (Leerwert).

Phosphattest

$150\ \mu\text{l}$ des klaren Überstands wurden mit 3 ml Phosphatreagenz versetzt. Parallel wurden 2 zusätzliche Ansätze als negative und positive Kontrolle ($150\ \mu\text{l}$ $0,1\ \text{N}\ \text{H}_2\text{SO}_4$ bzw. $0,6\ \text{mM}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$) bearbeitet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von $30\ \mu\text{l}$ Reduktor gestartet. Nach genau 10 min wurde die Extinktion der blau gefärbten Lösungen bei $650\ \text{nm}$ gemessen.

Auswertung

Die Phosphatkonzentration wurde nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet:
Lambert-Beer'sches Gesetz:

$$\Delta E = \varepsilon * d * c$$

$$\Rightarrow c_P = \Delta E / (\varepsilon_{\text{MoOx}} * d) * (V_{\text{PR}} + V_{\text{R}} + V_{\text{P}}) / V_{\text{P}}$$

c_P	Phosphatkonzentration	[mmol/l]
ΔE	gemessene Extinktionsdifferenz	
$\varepsilon_{\text{MoOx}}$	Extinktionskoeffizient von MoOx bei $650\ \text{nm}$	$3,1\ \text{cm}^2 / \mu\text{mol}$
d	Schichtdicke (Dicke der Küvette)	1 cm

V_{PR}	Volumen der Phosphatreagenz	3000 μ l
V_R	Volumen des Reduktors	30 μ l
V_P	Volumen der Probe im Phosphattest	150 μ l

$$\Rightarrow \quad c_P = \Delta E * 6,84$$

Mittels der berechneter Phosphatkonzentration konnte die Glykogen-Phosphorylase-Aktivität pro Platte zurückgerechnet werden, wobei

v	Glykogen-Phosphorylaseaktivität pro Platte	[U] = [μ mol/min]
V_L	Volumen des Zellysats	0,4 ml
t	Reaktionszeit für die Glykogenolyse	45 min
V_{LG}	Eingesetztes Probenvolumen	0,1 ml
V_T	Volumen der Testlösung	0,1 ml
V_{TCA}	Volumen der Trichloressigsäure	0,1 ml

$$\Rightarrow \quad v = c_P * (V_{LG} + V_T + V_{TCA}) / V_{LG} * V_L/t = \Delta E * 0,182$$

Von der Gesamtaktivität v pro Platte wurde die basale Aktivität abgezogen, um die tatsächliche Glykogen-Phosphorylase-Aktivität zu ermitteln.

$$v_{GPH} = v - v_b = (\Delta E_g - \Delta E_b) * 0,182$$

wobei	v_{GPH}	tatsächliche Glykogen-Phosphorylaseaktivität pro Platte	[U]
	v	gesamte Glykogen-Phosphorylaseaktivität pro Platte	[U]
	v_b	basale Glykogen-Phosphorylaseaktivität (Leerwert)	[U]
	ΔE_g	gesamte Extinktionsdifferenz (Probe)	
	ΔE_b	basale Extinktionsdifferenz (Leerwert)	

Da das Volumen des Zellysats bei den Experimenten mit frisch isolierten Zellen -anders als bei den kultivierten - 0,8 ml war, wurde auch der Faktor entsprechend korrigiert:

$$v = c_P * (V_{LG} + V_T + V_{TCA}) / V_{LG} * V_L/t = \Delta E * 0,364$$

$$v_{GPH} = v - v_b = (\Delta E_g - \Delta E_b) * 0,364$$

Lambert-Beer'sches Gesetz:

$$\Delta E = \varepsilon * c * d$$

bzw.

$$c = \Delta E / (\varepsilon_{\text{NADH}} * d) * (V_{\text{TL}} + V_{\text{P}}) / V_{\text{P}}$$

c [mmol/l]	Glucosekonzentration in der Probe	
ΔE	gemessene Extinktionsdifferenz	
$\varepsilon_{\text{NADH}}$ [cm ² /μmol]	Extinktionskoeffizient von NADH bei 365 nm	3,4
d [cm]	Schichtdicke (Dicke der Kuvette)	1
V _{TL} [μl]	Volumen der Testlösung	750
V _P [μl]	Volumen der Probe	20

$$\Rightarrow c = \Delta E * 11,32$$

3.6 Immunbiochemische Methoden

3.6.1 Vorbereitung von kultivierten Hepatocyten für FACS-Analyse und Immuncytochemie

Während frisch isolierte Hepatocyten direkt in die Nachweisverfahren eingesetzt werden konnten, mußten die kultivierten Zellen zur Analyse möglichst schonend von den Kulturschalen abgelöst werden.

Lösungen

PBS 10 x

NaCl	1,4 M	81,82 g/l
KCl	27 mM	2,02 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	90 mM	32,23 g/l
KH ₂ PO ₄	15 mM	2,04 g/l
		pH 6,8

PBS/EDTA

EDTA	2 mM	0,744 g
PBS (1x)		ad 100 ml

3.6.2 Durchflußcytometrie im Fluorescence-aktiviertem Cell-Sorter (FACS)

Bei der durchflußcytometrischen Analyse von Zellen im Fluoreszenz-aktivierten Cell-Sorter (FACS) wird Fluoreszenz- und Streulichtverhalten einzelner Zellen aufgezeichnet, die in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl definierter Wellenlänge passieren (Abb.8). Dadurch können biochemische und biophysikalische Eigenschaften wie Größe, Granularität oder Anwesenheit von bestimmten Oberflächenantigenen ermittelt und Zellpopulationen mit unterschiedlichen Eigenschaften identifiziert und ggf. quantitativ getrennt werden. Die Messung des Streulichtverhaltens im 180°-Winkel (Forward scatter, FS) gibt Informationen über die Größe der Zellen, im 90°-Winkel (Side scatter, SS) über die Granularität der Zellen. Zusätzlich können Markierungen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen - Fluoresceinisothiocyanat (FITC, grüne Fluoreszenz) oder R-Phycoerythrin (PE, rote Fluoreszenz) - zur Analyse von verschiedenen Oberflächenantigenen benutzt werden. In der Praxis bedeutet dies, dass es möglich ist, in einer inhomogenen Zellpopulation diejenigen Zellen gezielt zu identifizieren, die bestimmte Eigenschaften besitzen. Die Streu- und Fluoreszenzstrahlungen werden über Spiegelsysteme auf verschiedene, gefilterte Photodetektoren gelenkt und die Signale von Photoverstärkern aufgenommen. Dabei wird die Fluoreszenzstrahlung logarithmisch verstärkt. Jedes Signal wird digitalisiert (A/D-Wandler) und getrennt von den anderen als binärer Wert elektronisch gespeichert. In entsprechenden Computergraphiken lassen sich alle Parameter beliebig gegeneinander auftragen (z.B. Fluoreszenzintensität gegen Zellzahl, wie in dieser Arbeit dargestellt). So können einzelne Zellpopulationen statistisch innerhalb der Gesamtpopulation abgegrenzt und miteinander verglichen werden.

Lösungen

FACS-Puffer

FCS	1,5%	1,5 ml
Na-Azid (2 M)	0,1%	0,8 ml
PBS 1x		ad 100 ml

FACS-Fix“

FCS	1,5%	1,5 ml
Na-Azid (2 M)	0,1%	0,8 ml
Formaldehyd	1%	2,7 ml
PBS 1x		ad 100 ml

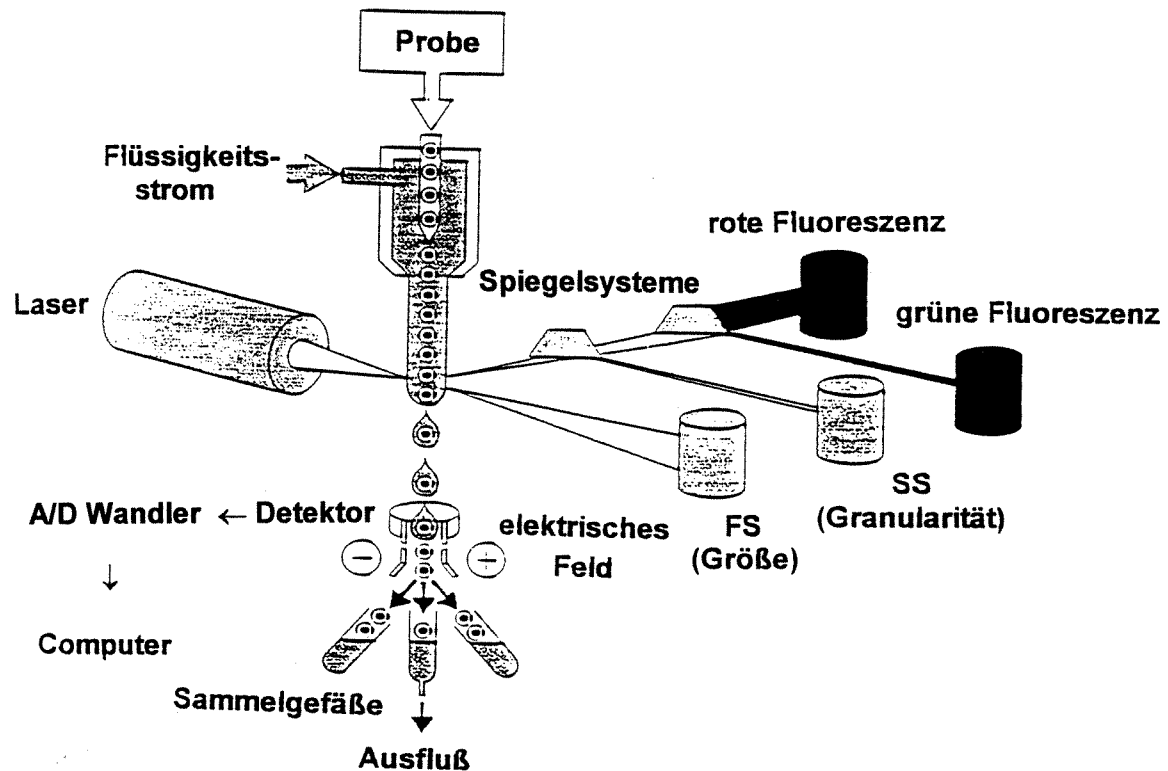


Abb.8: Schematische Darstellung eines Fluorescence-aktivierten Cell-Sorter.
 FS: "Foreward Scatter"; SS: "Side Scatter"

Durchführung

Frisch isolierte oder abgelöste kultivierte Zellen (vgl. 3.6.1) wurden mit FACS-Puffer gewaschen, gezählt und auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Pro Well einer rundbodigen 96-Lochplatte wurden $100 \mu\text{l}$ (2×10^5 Zellen) pipettiert und in einer Mikrotiterplatten-Zentrifuge bei 1400 rpm mit ausgeschalteten Bremse zentrifugiert. Die Platte wurde vorsichtig ausgeschlagen und die Zellen mit einem Vortex-Mixer in dem Restvolumen resuspendiert. Die Antikörper - R63 (anti C5a-Rezeptor, $4 \mu\text{g/ml}$) oder MOPC-21 (IgG1-Isotyp-Kontrolle, $10 \mu\text{g/ml}$) wurden in FACS-Puffer verdünnt und in einem Gesamtvolumen von $100 \mu\text{l}$ zu den Proben gegeben. Nach 45-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Platten erneut zentrifugiert, die Antikörperlösungen durch Ausklopfen entfernt und die Zellen 2x mit jeweils $150 \mu\text{l}$ FACS-Puffer gewaschen. Die Ansätze wurden mit $100 \mu\text{l}$ des sekundären FITC-gekoppelten Kaninchen-anti-Maus Antikörpers in einer 1:100 Verdünnung versetzt und die Platten für 45 min auf Eis lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x gewaschen, in $200 \mu\text{l}$ "FACS-Fix" aufgenommen und bis zur Analyse im Dunkeln aufbewahrt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu vermeiden.

Die Anregungswellenlänge des hier benutzten Durchflußcytometers (EPICS-XL, COULTER, Krefeld) lag bei 488 nm. Damit konnte die emittierte Grünfluoreszenz von Fluoresceinisothiozyanat (FITC) bei 530 nm detektiert werden.

3.6.3 Immunocytochemie

Lösungen

PBS (s.3.6.2)

Paraformaldehyd (1 %)

Paraformaldehyd	1 %	1 g
PBS 1x		ad 100 ml

Die Lösung wurde direkt vor dem Gebrauch angesetzt.

Durchführung

Die frisch isolierten oder abgelösten kultivierten Zellen (s. 3.6.1) wurden in PBS gewaschen und auf eine Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Verdünnung wurden 150 μ l ($\cong 7,5 \times 10^3$ Zellen) auf Cytospin-Objektträger (HistoBond™ Objektträger mit speziellen Aufsätzen, Berthold Schlag, Bergisch Gladbach) pipettiert und in einer Cytopro™ Cytospin Zentrifuge (Berthold Schlag, Bergisch Gladbach) bei 1300 rpm für 6 min sedimentiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen auf den Objektträgern für 10 min in 1% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert und anschließend 3 x für 5 min mit kaltem PBS gewaschen. Die Proben auf den Objektträgern wurden mit einem Fettstift begrenzt und mit den primären Antikörper R63 (anti-C5a-Rezeptor Antikörper, 5 μ g/ml) oder MOPC-21 (IgG1-Isotyp-Kontrolle, 10 μ g/ml) in einem Volumen von 150 μ l inkubiert. Nach 50 min Inkubationszeit wurden die Zellen 3 x mit kaltem PBS gewaschen und für weitere 50 min mit dem sekundären Fluoresceinisothiozyanat (FITC) - gekoppelten Ziegen-anti-Maus Antikörper (1:100 in PBS verdünnt) ebenfalls bei 4°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu verhindern. Nach 3 Waschschrinen (3 x 5 min mit kaltem PBS) wurden die Präparate mit einem Tropfen PBS versetzt, um ein Austrocknen zu vermeiden, und mit einem UV-Mikroskop (Zeiss Photomicroscope III, Zeiss, Oberkochen) analysiert und photographiert.

Die FACS-Analyse sowie die Immunocytochemischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung Immunologie (Dr. G. Schlaf, Prof. O.Götze) durchgeführt.

3.7 Statistische Auswertungen

Alle quantitativ erhobenen Daten wurden als absolute oder relative Werte, oder in Prozent \pm 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 ab einen p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant unterschiedlich betrachtet.

4. ERGEBNISSE

4.1 Isolierung von Hepatocysten mit intakten Oberflächenstrukturen

Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden die Hepatocysten durch nicht-rezirkulierende Perfusion mit einer Ca^{2+} -freien, EDTA-haltigen Lösung ohne Verwendung von Kollagenase präpariert [Meredith, 1988]. Durch diese Methode ließen sich auf eine schonende Weise vitale Hepatocysten isolieren, wobei die Oberflächenstrukturen intakt und funktionell aktiv blieben. Aus diesem Grund konnten die frisch isolierten Hepatocysten direkt nach der Präparation zum Nachweis der C5aR-Expression auch auf Proteinebene benutzt werden.

4.2 Induktion funktioneller C5a-Rezeptoren in Hepatocysten *in vivo* bei experimentell durch LPS induzierten Entzündungen

Unter normalen Bedingungen exprimieren Hepatocysten keine C5a-Rezeptoren (C5aR) [Schieferdecker et al., 1997; Schlaf et al., 1999]. Die in verschiedenen Studien gezeigte vermehrte C5aR-mRNA-Expression in Ratten- [Akatzu et al., 1997; Fukuoka et al., 1998] und Mäuselebern [Haviland et al., 1995] nach LPS-Stimulation könnte zumindestens zum Teil auf eine *de novo* C5aR-Expression in Hepatocysten zurückzuführen sein. Um diese Hypothese zu verifizieren oder falsifizieren, wurden experimentell durch intraperitoneale (*i.p.*) Injektion von LPS Entzündungen in Ratten induziert und untersucht, ob diese Behandlung eine Expression funktioneller C5aR in Hepatocysten bewirkt.

4.2.1 Induktion experimenteller Entzündungen in Ratten durch *i.p.* Injektion von LPS

In der Literatur sind zur Induktion LPS-abhängiger Entzündungen LPS-Mengen von 0,025 μg LPS/g Körpergewicht [Derick et al., 1991] bis zu 20 μg LPS/g Körpergewicht [Uhlir et al., 1995; Sorrells et al., 1996] beschrieben. Dabei wird eine LPS-Dosis von 5 μg /g Körpergewicht allgemein als sublethal angesehen [Hafenrichter et al., 1994; Omar et al., 1998; Ikejima et al., 1998]. Erste Versuche wurden daher zunächst mit dieser LPS-Konzentration durchgeführt. In diesen Experimenten führte eine *i.p.*-Injektion von 5 μg LPS (E.Coli O26:B6)/g Körpergewicht bereits innerhalb der ersten Stunden zu Symptomen, die typisch für akute Entzündungen sind (struppiges Fell, Schlappeheit, Apathie). Die Körpertemperatur wurde nicht gemessen, beim Anfassen der Tiere konnte aber Fieber

festgestellt werden, was den Literaturdaten entspricht [Cartmell et al., 1999] In den ersten zwei Versuchsserien starb von 3 Ratten je ein Tier innerhalb von 10 h. Aufgrund dieser hohen Mortalitätsrate wurde die LPS-Dosis auf 2,5 µg/g Körpergewicht reduziert. Die Ratten zeigten weiter die oben genannten Symptome, die Überlebensrate ließ sich auf diese Weise jedoch auf 100% erhöhen. Kontrolltiere, die lediglich mit NaCl/RSA gespritzt wurden, zeigten keine Symptomatik.

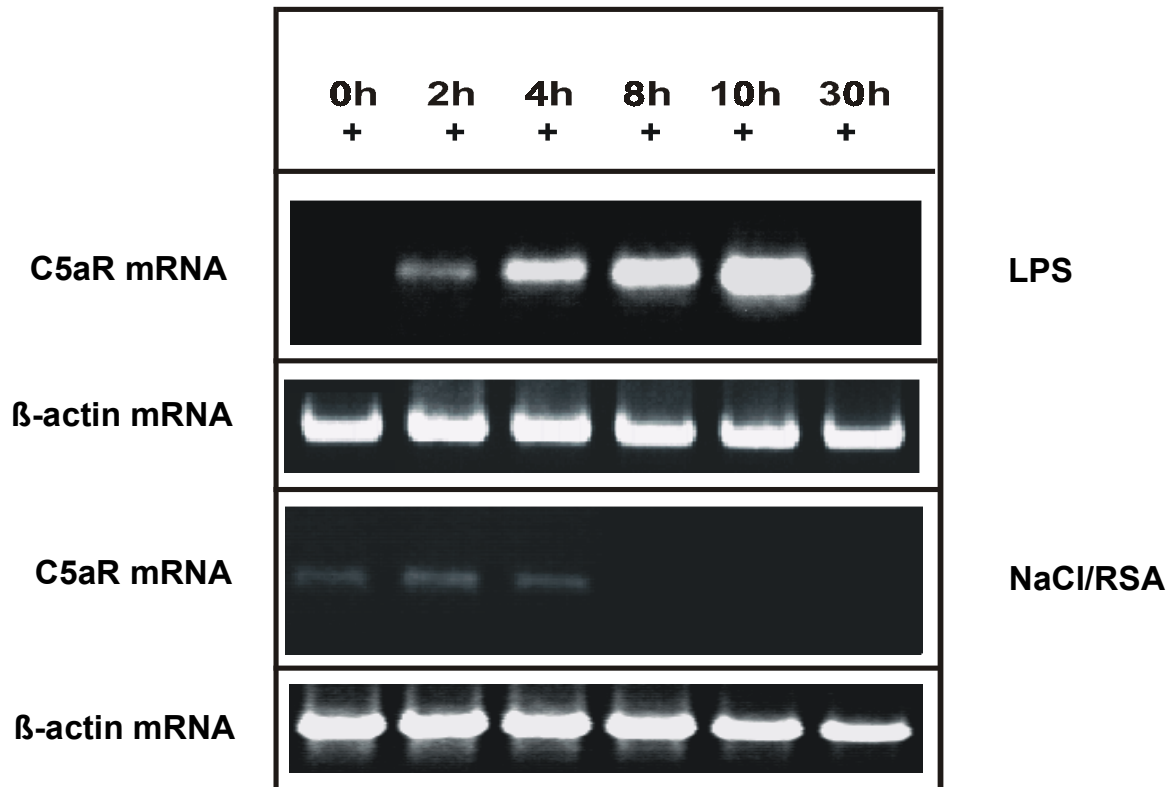


Abb.9: Induktion von C5aR-mRNA in frisch isolierten HC nach *in vivo* Behandlung von Ratten mit LPS. Männliche Wistar-Ratten wurden *i.p.* mit 2,5 µg LPS/g Körpergewicht in einem Gesamt-Volumen von 500 µl NaCl/RSA oder nur mit NaCl/RSA gespritzt. Unmittelbar nach der Injektion sowie nach 2 h, 4 h, 8 h, 10 h und 30 h wurden Hepatocyten präpariert und Gesamt-RNA aus jeweils 2×10^6 Zellen isoliert, mit DNase I behandelt und revers transkribiert. Die erhaltene cDNA wurde mittels PCR in Gegenwart von Sequenz-spezifischen Primern für C5aR (511 bp) oder β-Actin (769 bp) amplifiziert, anschließend elektrophoretisch in 2%-igen Agarosegelen aufgetrennt und nach Anfärbung mit Ethidiumbromid analysiert. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten.

4.2.2 C5aR-mRNA Expression in frisch isolierten Hepatocyten aus LPS-behandelten Ratten

Aus Lebern LPS-behandelter Ratten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Hepatocyten präpariert. Direkt nach der Präparation wurde Gesamt-RNA isoliert, cDNA synthetisiert und diese mit Sequenz-spezifischen Primern für C5aR und β -Actin amplifiziert.

Die *in vivo*-Behandlung von Ratten mit LPS führte in Hepatocyten zu einer Zeit-abhängigen C5aR-mRNA-Expression. Diese war bereits 2 h nach LPS-Injektion schwach nachweisbar, erreichte ihr Maximum nach 10 h und konnte nach 30 h nicht mehr detektiert werden (Abb.9). Die Größe der PCR-Produkte entsprach den zu erwartenden 511 bp für C5aR und 769 bp für β -Actin, die Identität der Produkte wurde durch Sequenzierung bestätigt.

In Hepatocyten aus Kontrolltieren konnte keine oder nur eine sehr schwache C5aR-mRNA-Expression nachgewiesen werden, die signifikant geringer war als die LPS-induzierte.

4.2.3 C5aR-Protein-Expression in frisch isolierten Hepatocyten aus LPS-behandelten Ratten

Da die Hepatocyten nach Meredith ohne Proteasen präpariert wurden, konnte eine mögliche LPS-abhängige C5aR-Expression auch in frisch isolierten Zellen auf Proteinebene untersucht werden. Während für die FACS-Analyse suspendierte Hepatocyten verwendet wurden, wurden die Zellen für den immunocytochemischen Nachweis auf Objektträger fixiert. In beiden Fällen wurden die frisch isolierten Hepatocyten aus LPS-behandelten und Kontrollratten dann mit dem monoklonalen anti-Ratten-C5aR-Antikörper R63 inkubiert und eine mögliche Bindung an vorhandene C5a-Rezeptoren mittels eines sekundären FITC-gekoppelten Kaninchen-anti-Maus-IgG1 Antikörper visualisiert. Um eventuelle unspezifische Bindung auszuschließen, wurden die Zellen parallel hierzu mit dem anti-IgG1-Isotyp-Kontroll-Antikörper MOPC-21 inkubiert.

FACS-Analyse

Mittels FACS-Analyse war 4 h nach der LPS-Behandlung mit dem C5aR-Antikörper R63 kein C5aR-Protein nachweisbar. Nach 8 h und 10 h exprimierten frisch isolierten Hepatocyten dagegen deutlich C5aR-Protein; die Expression unterschied sich zu diesen beiden Zeitpunkten nicht signifikant. Wie auf mRNA-Ebene konnte auch auf der Protein-Ebene nach 30 h keine C5aR-Expression mehr detektiert werden. In Hepatocyten aus

Kontrollratten war über den gesamten Zeitraum von bis zu 30 h keine C5aR-Protein-Expression nachweisbar. Die Markierung mit dem Kontroll-Antikörper MOPC-21 (IgG1-Isotyp-Kontrolle) unterschied sich nicht von derjenigen mit dem FITC-gekoppelten sekundären Antikörper (nicht gezeigt); die entsprechenden Kurven geben daher die Eigenfluoreszenz der Zellen wieder.

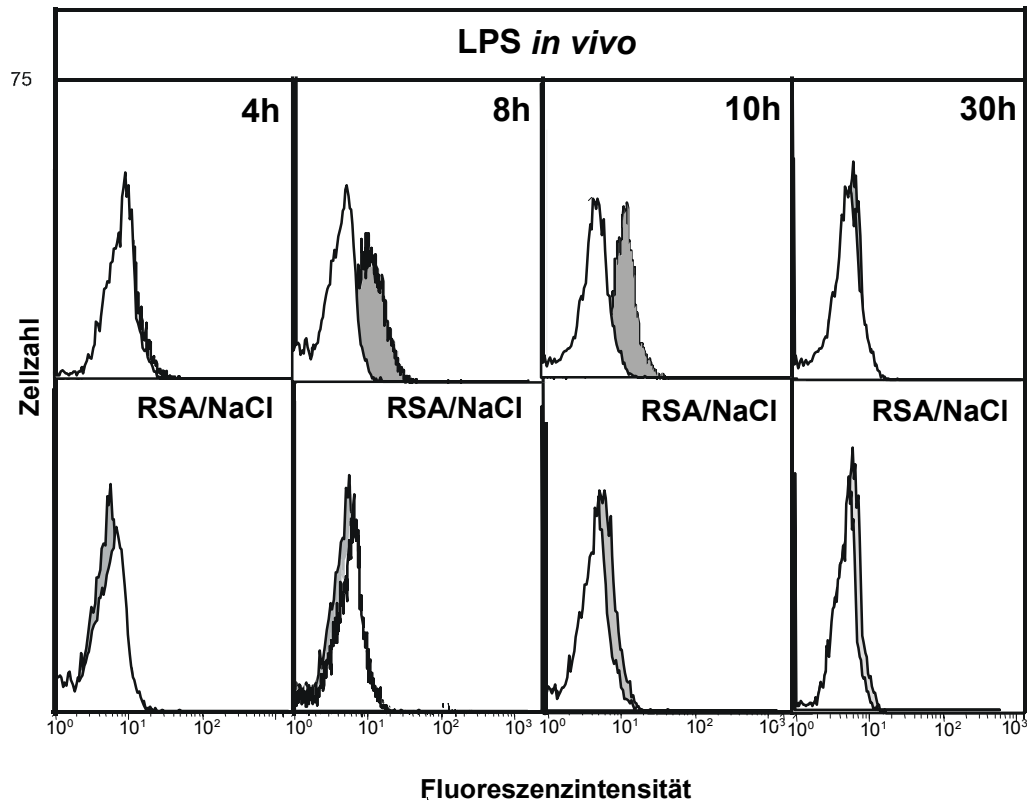


Abb.10: Induktion von C5aR-Protein in frisch isolierten HC nach *in vivo* Behandlung von Ratten mit LPS (FACS-Analyse). Die Hepatocyten wurden aus LPS- und unbehandelten Ratten wie in Abb.9 beschrieben präpariert. Die frisch isolierten HC wurden mit R63 (anti-C5aR mAK) oder MOPC-21 (anti-IgG1-Isotyp-Kontroll-AK) und anschließend mit einem FITC-gekoppelten sekundären Kaninchen-anti-Maus AK inkubiert und durchflußcytometrisch analysiert. Die gezeigten Histogramme geben die Fluoreszenzintensität (X-Achse) gegen die Zahl Antikörper-markierter Zellen (Y-Achse) wieder. Eine Rechtsverschiebung der Kurve bedeutet daher eine höhere Fluoreszenzintensität und damit eine vermehrte C5aR-Protein-Expression. Die Fluoreszenzintensität für die mit R63 inkubierten HC sind in grau, die Eigenfluoreszenz in weiß dargestellt. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

Immuncytochemie

In frisch isolierten Hepatocysten aus LPS-behandelten Ratten war nach 10 h das C5aR-Protein-Expression stark exprimiert (Abb.11). Im Unterschied zu den FACS-Daten wurde immuncytochemisch eine C5aR-Protein-Expression auch 4 h nach der Behandlung mit LPS nachgewiesen. In Hepatocysten aus den NaCl/RSA-gespritzten Kontrollratten war dagegen kein C5aR-Protein detektierbar.

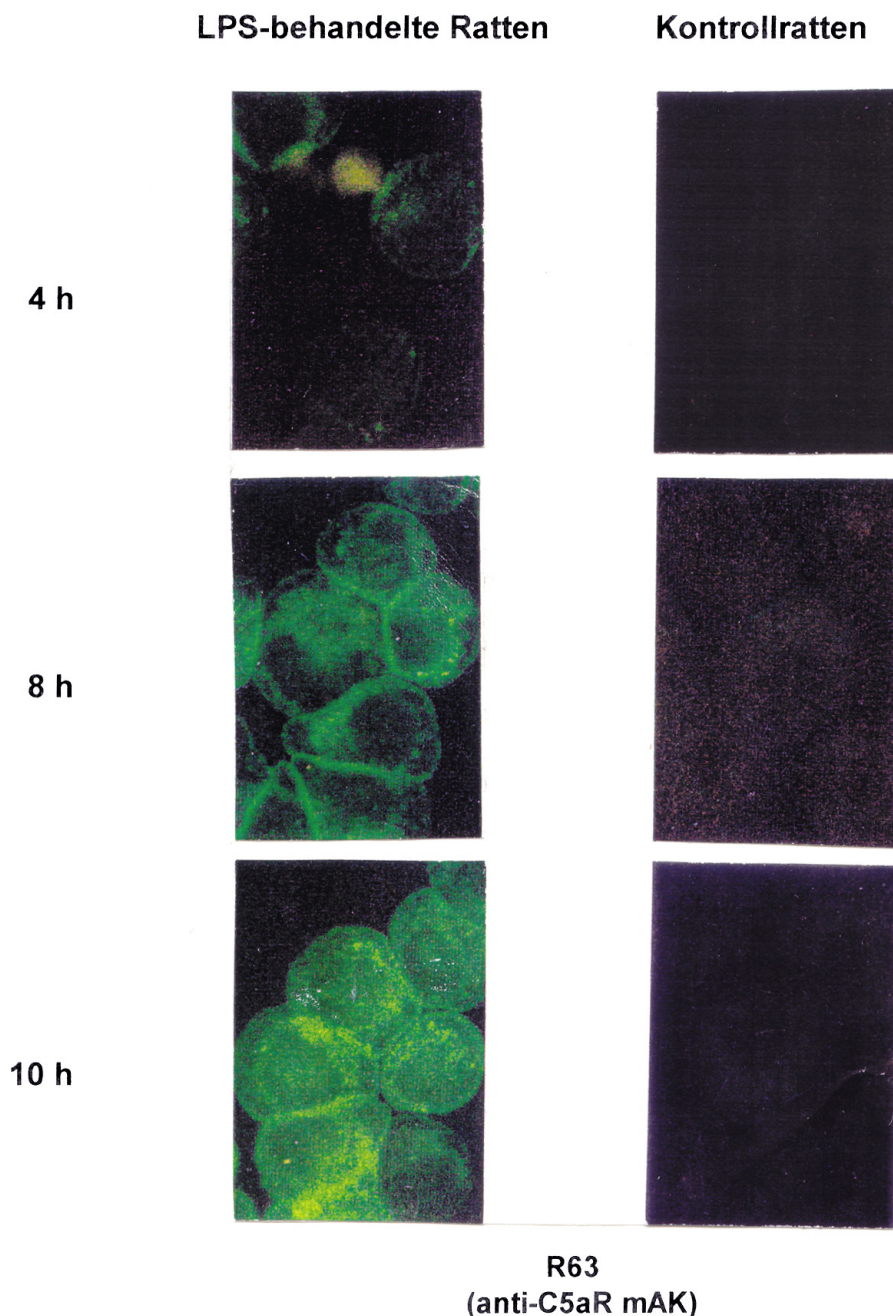


Abb.11: Induktion von C5aR-Protein in frisch isolierten HC nach *in vivo* Behandlung von Ratten mit LPS (Immuncytochemie). Die Hepatocysten wurden aus LPS und unbehandelten Ratten wie in Abb.9 beschrieben präpariert. Die frisch isolierten HC wurden auf Objektträger mit Paraformaldehyd auf Objektträger fixiert, mit R63 (anti-C5aR-mAK) und anschließend mit einem FITC-gekoppelten sekundären Kaninchen-anti-Maus AK inkubiert. Die Detektion erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop.

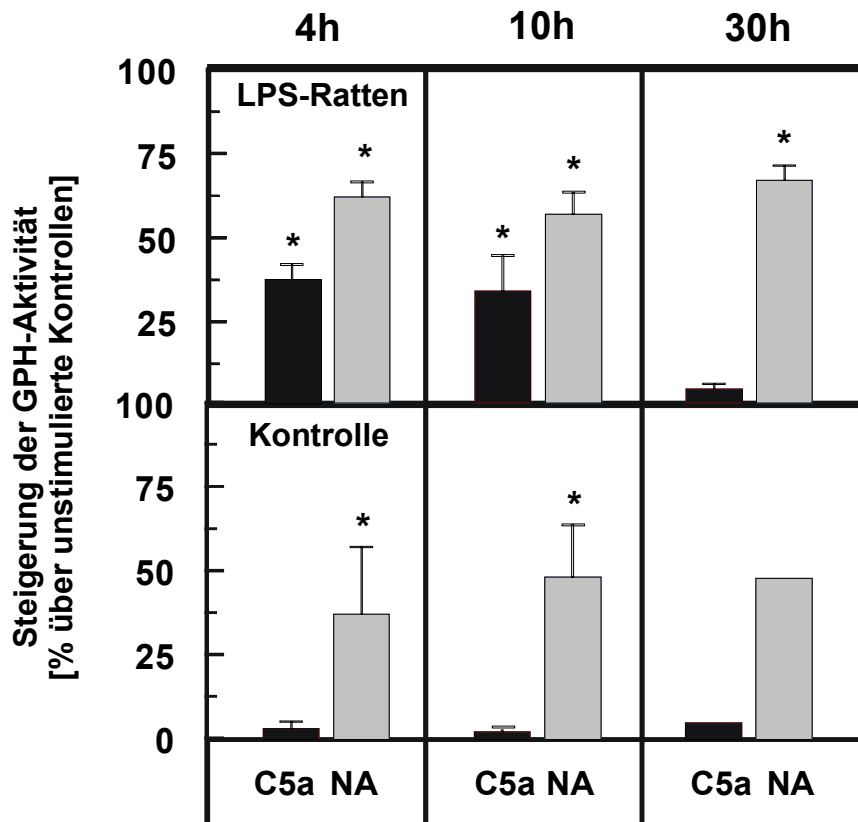


Abb.12: Direkte C5a-abhängige Steigerung der Glykogen-Phosphorylase-Aktivität in frisch isolierten HC nach *in vivo* Behandlung von Ratten mit LPS. Die Hepatocyten wurden aus LPS und unbehandelten Ratten wie in Abb.9 beschrieben isoliert. Nach 15-minütiger Vorinkubation mit 20 μ M Indomethacin wurden die frisch isolierten HC mit 1 μ g/ml rrC5a oder 1 μ M NA für 2 min stimuliert. Die GPH-Aktivität in den Zellhomogenaten wurde im enzymatischen Test bestimmt und die Steigerung in Prozent über unstimulierten Kontrollen (100%) dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten, nur bei 30 h n=1 * p<0,05 gegenüber die unstimulierten Kontrollen (Student's t-Test für ungepaarte Proben).

Die Basalwerte für unstimulierte Kontrollen betragen bei den LPS-behandelten Ratten $36,7 \pm 1,7$ nmol/min; $40 \pm 1,7$ nmol/min; $36,7 \pm 1,7$ nmol/min; bei den Kontrollratten 35 ± 10 nmol/min, 25 ± 5 nmol/min; 35 nmol/min (jeweils 4 h, 10 h und 30 h - Werte).

4.2.4 Direkte Prostanoid-unabhängige Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase durch rrC5a in frisch isolierten Hepatocyten aus LPS-behandelten Ratten

Um die Funktionsfähigkeit der neu exprimierten C5aR zu überprüfen, wurde untersucht, ob rrC5a in Hepatocyten aus LPS-behandelten Ratten die hepatozelluläre Glykogenphosphorylase direkt aktiviert.

Hepatocyten wurden nach 4 h, 10 h bzw 30 h aus LPS-behandelten Ratten isoliert und mit 1 μ g/ml (100 nM) rrC5a oder 1 μ M Noradrenalin für 2 min stimuliert. Der Einfluß eventueller Verunreinigungen mit Nichtparenchymzellen wurde durch 15-minütige

Vorinkubation in Gegenwart des Prostanoidsynthese-Inhibitors Indomethacin (20 μM) ausgeschlossen. 4 h und 10 h nach LPS-Behandlung der Ratten stimulierte rrC5a in isolierten Hepatocyten direkt die Glykogen-Phosphorylase-Aktivität (Abb.12). 30 h nach LPS-Behandlung der Tiere hatte rrC5a keinen Einfluß auf die hepatozelluläre Glykogen-Phosphorylase-Aktivität. In Hepatocyten aus unbehandelten Tieren aktivierte rrC5a die Glykogen-Phosphorylase zu keinem der untersuchten Zeitpunkte (Abb.12).

Die Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase durch Noradrenalin unterschied sich nicht signifikant zwischen Hepatocyten aus Kontroll- und LPS-behandelten Ratten und blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant (Abb.12).

4.2.5 Direkte Prostanoid-unabhängige Glucose-Freisetzung durch rrC5a in perfundierten Lebern LPS-behandelter Ratten

Zum Zeitpunkt der stärksten C5aR-Protein-Expression (s. 4.2.3) - d.h. 10 h nach LPS-Injektion - wurde eine monovaskuläre, nicht rezirkulierende Leberperfusion durchgeführt, wobei in die Portalvene rrC5a bzw. Noradrenalin als Positivkontrolle für jeweils 30 s infundiert wurden. Anschließend wurden die Glucose-Konzentrationen in den Effluaten mittels eines enzymatischen Tests, sowie die Flußraten mittels Bestimmung der Volumen-Veränderung des Effluats bestimmt.

LPS-behandelte und Kontrolltiere unterschieden sich nicht signifikant in ihrer basalen Glucose-Abgabe. RrC5a steigerte sowohl in perfundierten Lebern aus LPS-behandelten Ratten als auch - wie bereits früher gezeigt [Schieferdecker et al., 1999] - aus Kontrolltieren die Glucose-Freisetzung und reduzierte den Fluß (Abb.13). In Kontrolltieren waren beide Effekte in Gegenwart des Cyclooxygenase-Inhibitors Indomethacin und des Thromboxan A₂-Rezeptor-Antagonisten Daltroban vollständig gehemmt [vgl. Schieferdecker et al., 1999]. Dies belegt die Vermittlung der C5a-Wirkungen durch Prostanoiden aus Nichtparenchymzellen. In Lebern LPS-behandelter Ratten wurden im Unterschied hierzu die C5a-abhängigen Glucose-Abgabe und Fluß-Verminderung durch die o.g. Inhibitoren nicht gehemmt. Dies deutet darauf hin, daß die beobachteten Stoffwechselveränderungen Resultat einer direkten, Prostanoid-unabhängigen rrC5a-Wirkung auf die Hepatocyten waren.

Um die Funktionsfähigkeit der Leber zu überprüfen, wurde am Ende jeder Perfusion Noradrenalin (Endkonzentration 1 μM) infundiert. Die Noradrenalin-induzierte Glucose-Freisetzung unterschied sich weder zwischen LPS-behandelten und Kontrolltieren noch in An- bzw. Abwesenheit von Indomethacin und Daltroban (nicht gezeigt).

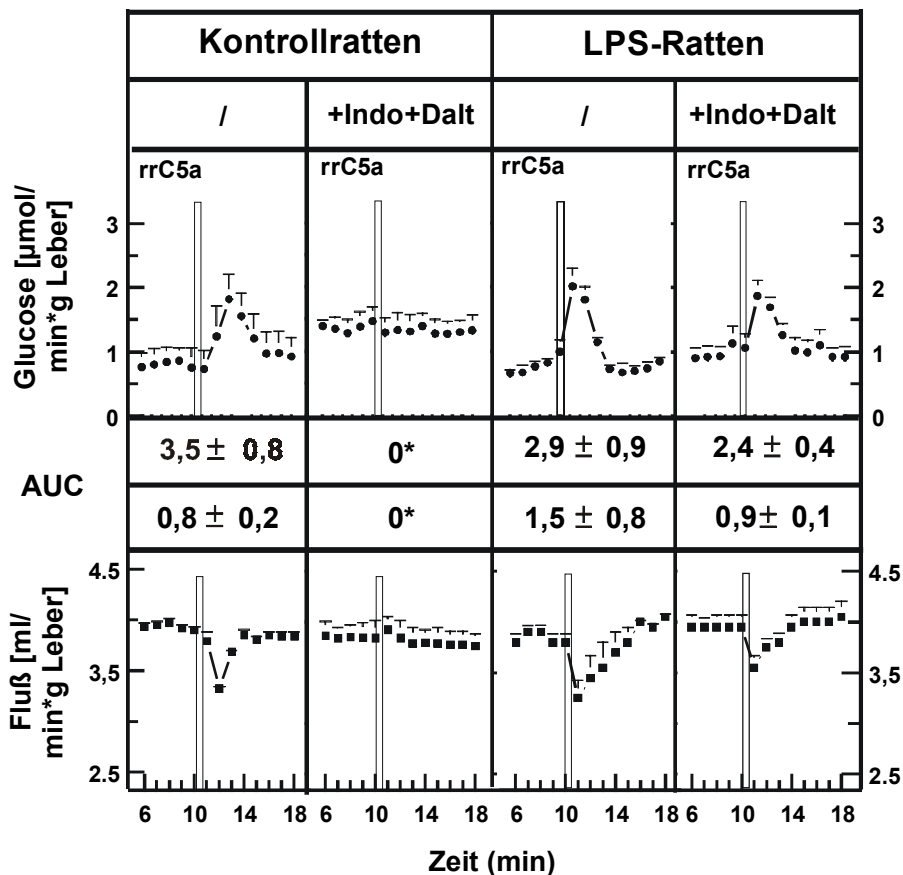


Abb.13: Fehlende Hemmung der C5a-abhängige Glucose-Freisetzung durch Indomethacin und Daltroban in perfundierten Lebern nach *in vivo*-Behandlung von Ratten mit LPS. Die LPS-Behandlung der Ratten erfolgte wie in Abb.9 beschrieben. Lebern von LPS behandelten und Kontrollratten wurden 10 h nach der Injektion über die *Vena portae* nicht-rezirkulierend perfundiert. Nach einer 30-minütigen Vorperfusion in Gegenwart oder Abwesenheit von Indomethacin (20 µM) und Daltroban (20 µM) wurden rrC5a (Endkonzentration 1 µg/ml) und nach weiteren 10 min NA (Endkonzentration 1 µM) für jeweils 30 s infundiert. Proben für die enzymatische Bestimmung der Glucose-Konzentration und Flußraten wurden im 1 min-Takt entnommen. Die Flächen unter den Kurven (AUC) entsprechen µmol/g Leber für die Glucose bzw. ml/g Leber für den Fluß. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM aus 3 (LPS-Ratten) und 4 (Kontrollratten) unabhängigen Experimenten. * p<0,05 gegenüber Perfusionen ohne Indomethacin und Daltroban (Student's t-Test für ungepaarte Proben). Die Werte für die Kontrollratten wurden aus Schieferdecker et al., 1999 übernommen.

4.3 Induktion funktioneller C5a-Rezeptoren in Hepatocyten *in vivo* bei experimentell durch IL-6 induzierten Entzündungen

LPS ist ein zwar sehr wirkungsvoller aber auch unspezifischer Auslöser experimenteller Entzündungen. Durch Wechselwirkung mit LPS-Rezeptor-tragenden Zellen

wird die Freisetzung einer Vielzahl sekundärer Mediatoren mit vielfältigen Wirkungen ausgelöst. Zu diesen Mediatoren zählen insbesondere proinflammatorische Cytokine wie IL-6, IL-1 β und TNF α . Um zu untersuchen, ob sekundäre Mediatoren an der Vermittlung des LPS-Effekts beteiligt sein könnten, wurde untersucht, ob eine *in vivo*-Behandlung mit IL-6 als Haupt-Entzündungsmediator in der Leber [Castell et al., 1989; Christ et al., 1999] funktionelle C5a-Rezeptoren in Hepatocyten induziert.

4.3.2 Induktion experimenteller Entzündungen in Ratten durch i.p. Injektion von IL-6

In der Literatur sind zahlreiche durch das proinflammatorische Cytokin IL-6 simulierte Entzündungsmodelle beschrieben. Die applizierten Mengen IL-6 variieren zwischen 0,001-0,25 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht [Schobitz et al., 1995; Geisterfer et al., 1995]. Da auch bekannt war, daß eine i.p. Injektion von 0,02 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht die Synthese von α_2 -Makroglobulin in Rattenleber steigerte [Lienenlücke, Diplomarbeit], ohne Nebeneffekte oder Todesfälle bei den Versuchstieren, wurde diese Dosis für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Versuche bevorzugt. Tatsächlich wurden bei den IL-6 behandelten Ratten Müdigkeit und leicht erhöhte Körpertemperatur beobachtet, jedoch die Überlebensrate betrug 100%.

4.3.2 C5aR-mRNA Expression in frisch isolierten Hepatocyten aus IL-6-behandelten Ratten

Die Untersuchung der C5aR-Expression nach IL-6-Gabe *in vivo* erfolgte wie unter 4.2.2 beschrieben. Ebenso wie die Behandlung von Ratten mit LPS (vgl. 4.2) führte auch eine *i.p.* Injektion von 0,02 μg rhIL-6/g Körpergewicht zu einer zeitabhängigen C5aR-mRNA Expression in Hepatocyten. Anders als in den LPS-behandelten Ratten war die maximale C5aR-Expression bereits nach 4 h erreicht und blieb über die folgende 6 h nahezu konstant. Wie im Falle von LPS war auch 30 h nach rhIL-6 keine signifikante C5aR-mRNA-Expression mehr nachweisbar (Abb. 14). Als Kontrolltiere wurden die gleichen Tiere verwendet wie in Abb. 9.

In den Versuchen zur IL-6 abhängigen C5aR-Expression wurde aus Kostengründen mit rhIL-6 und nicht rIL-6 verwendet. Um die bereits in früheren Studien gezeigte Wirksamkeit von rhIL-6 in der Ratte [Bartalena et al., 1994] zu bestätigen, wurden parallel auch Versuche mit rIL-6 durchgeführt. Hierbei zeigten sich 8 h nach Injektion für die beiden Reagenzien keine signifikanten Unterschiede in der Wirkung auf die C5aR-mRNA-Expression in Hepatocyten. (Abb. 14c).

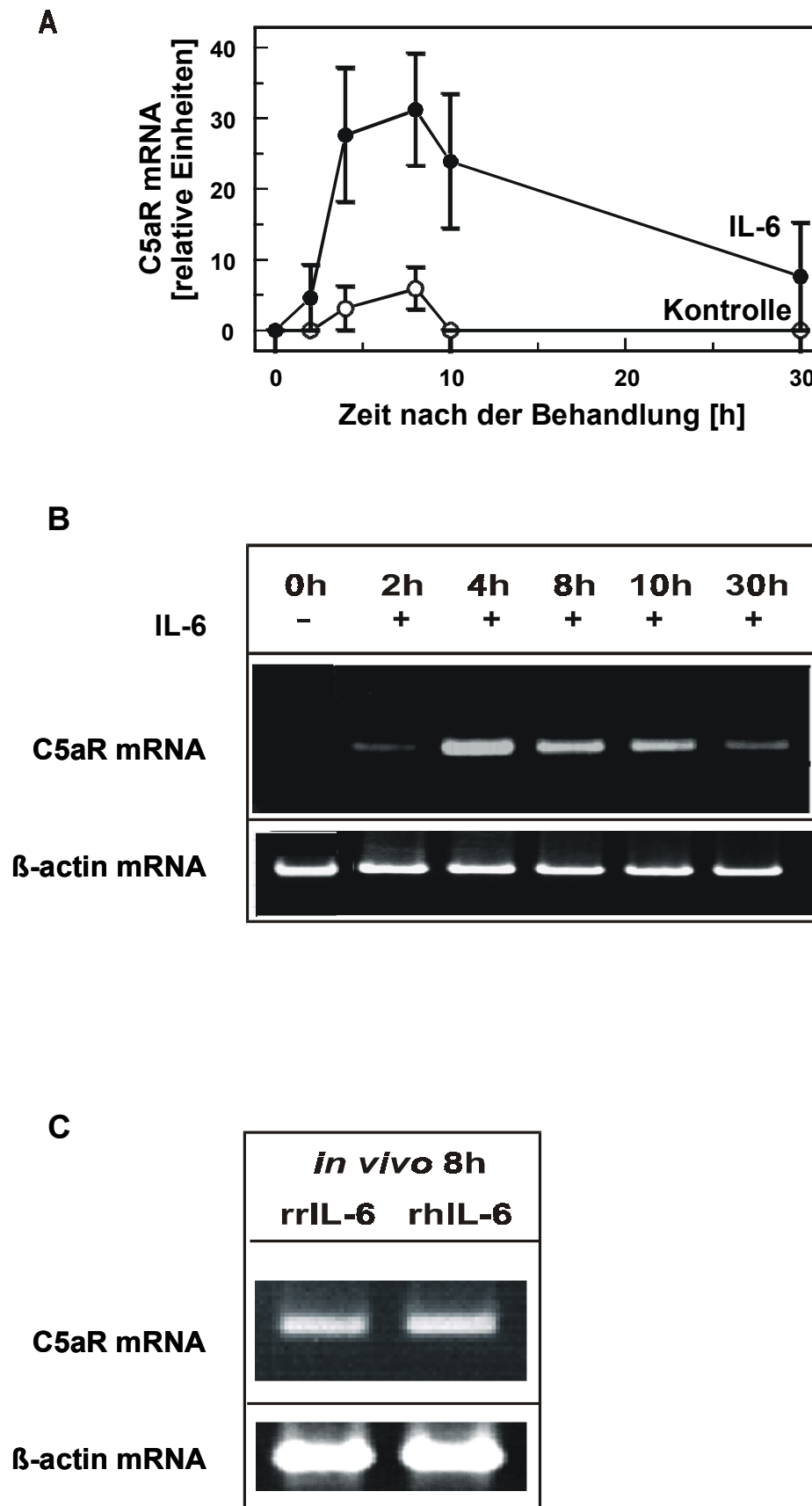


Abb.14: Induktion von C5aR-mRNA in frisch isolierten HC nach *in vivo* Behandlung von Ratten mit IL-6. Männliche Wistar-Ratten wurden *i.p.* mit 0,02 μ g rhIL-6/g Körpergewicht (**A und B**) bzw mit 0,02 μ g rIL-6/g Körpergewicht (**C**) in einem Gesamt-

Volumen von 500 μ l NaCl/RSA (IL-6) oder nur mit NaCl/RSA (Kontrolle) initiiert. Nach 2 h, 4 h, 8 h, 10 h und 30 h wurden Hepatocyten präpariert und Gesamt-RNA aus gleichen Mengen Zellen (2×10^6) isoliert, mit DNase I behandelt und revers transkribiert. Die erhaltene cDNA wurde mittels PCR in Gegenwart von sequenzspezifischen Primern für C5aR (511 bp) oder β -Actin (769 bp) amplifiziert und anschließend elektrophoretisch in 2%-igen Agarosegelen aufgetrennt und nach Anfärbung mit Ethidiumbromid analysiert. **(A)** Densitometrische Auswertung der Agarosegele. Mittelwerte \pm SEM in relativen Einheiten von 3 (0 h, 2 h, 4 h, 8 h) oder 2 (30 h) unabhängigen Versuchen. **(B)** Repräsentatives RT-PCR-Ergebnis. **(C)** C5aR-mRNA-Expression 8h nach *in vivo*-Behandlung rrIL-6 und rhIL-6

4.3.3 C5aR-Protein-Expression in frisch isolierten Hepatocyten aus IL-6-behandelten Ratten

Die Versuche wurden analog zu denen mit LPS-behandelten Ratten durchgeführt. (vgl. 4.2.3).

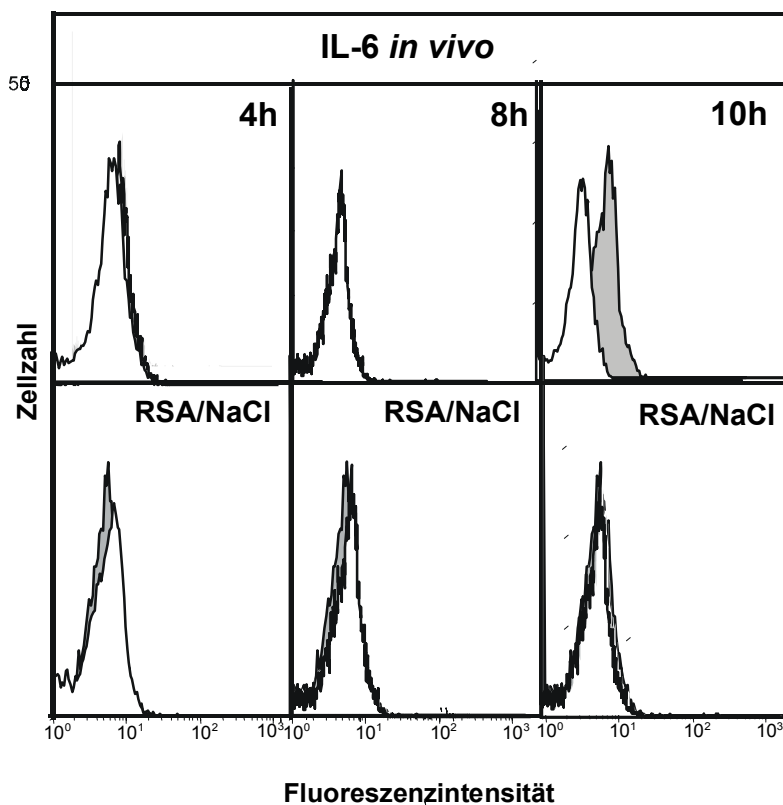


Abb.15: Induktion von C5aR-Protein in frisch isolierten HC nach *in vivo* Behandlung von Ratten mit rhIL-6 (FACS-Analyse). Die Hepatocyten wurden aus rhIL-6 und unbehandelten Ratten wie in Abb.14 beschrieben präpariert. Die frisch isolierten HC wurden mit R63 (anti-C5aR mAK) oder MOPC-21 (anti-IgG1-Isotyp-Kontroll-AK) und anschließend mit einem FITC-gekoppelten sekundären Kaninchen-anti-Maus AK inkubiert und durchflußcytometrisch analysiert. Die gezeigten Histogramme geben die Fluoreszenzintensität (X-Achse) gegen die Zahl Antikörper-markierter Zellen (Y-Achse) wieder. Eine Rechtsverschiebung der Kurve bedeutet damit eine höhere Fluoreszenzintensität und daher eine vermehrte C5aR-Protein-Expression. Die Fluoreszenzintensität für die mit R63 inkubierten HC sind in grau, die Eigenfluoreszenz in weiß dargestellt. Die Abb.15 zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

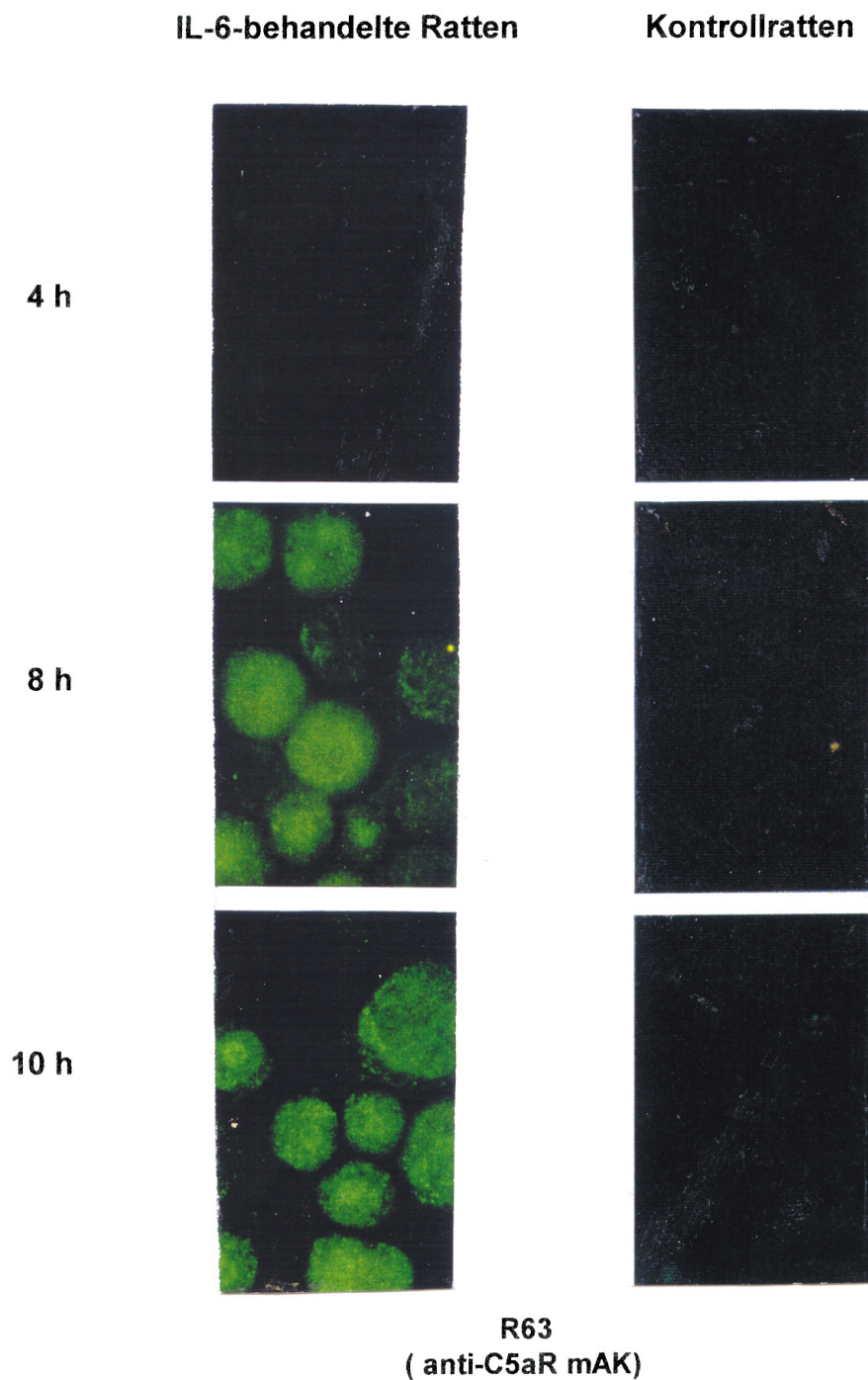


Abb.16: Induktion von C5aR-Protein in frisch isolierten HC nach *in vivo* Behandlung von Ratten mit rhIL-6 (Immuncytochemie). Die Hepatocyten wurden aus rhIL-6 und unbehandelten Ratten wie in Abb. 14 beschrieben präpariert. Die frisch isolierten HC wurden auf Objektträger fixiert und nach Paraformaldehyd-Fixierung mit R63 (anti-C5aR-mAK) und anschließend mit einem FITC-gekoppelten sekundären Kaninchen-anti-Maus AK inkubiert. Die Detektion erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop.

Immuncytochemie

Auch mittels Immuncytochemie war 4 h nach IL-6-Injektion keine C5aR-Expression in Hepatocyten detektierbar. Nach 8-10 h konnte dagegen eine starke C5aR-Expression nachgewiesen werden, die sich zu den beiden Zeitpunkten nicht signifikant unterschied (Abb. 16). In Hepatocyten aus RSA/ NaCl-gespritzten Ratten war zu keinem Zeitpunkt eine signifikante C5aR-Protein-Expression nachweisbar. Kontrollfärbungen mit MOPC-21 (anti-IgG1-Isotyp-Kontroll-AK) ergaben weder in Hepatocyten aus IL-6-behandelten Ratten noch aus Kontrolltieren ein positives Signal (nicht gezeigt).

4.3.4 Direkte Prostanoid-unabhängige Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase durch rrC5a in frisch isolierten Hepatocyten aus IL-6-behandelten Ratten

Die Funktionsfähigkeit der *de novo* exprimierten C5a-Rezeptoren wurde auch hier wie unter 4.2.4 beschrieben durch eine direkte rrC5a-abhängige Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase getestet (Abb. 17). 4 h nach Injektion von rhIL-6 war in frisch isolierten Hepatocyten nur eine schwache, nicht signifikante Steigerung der Glykogen-Phosphorylase-Aktivität durch rrC5a nachweisbar. Dagegen konnte rrC5a 8 h und 10 h nach rhIL-6-Behandlung der Ratten in Hepatocyten direkt die Glykogen-Phosphorylase aktivieren.

Als Positivkontrolle wurden Hepatocyten aus den gleichen Präparationen mit Noradrenalin stimuliert. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede, weder in den verschiedenen Testgruppen noch zu den verschiedenen Zeitpunkten beobachtet werden (Abb.17).

Auch in diesem funktionellen Test wurde die Wirksamkeit von rhIL-6 und rrlL-6 verglichen (s. 4.3.1): 10 h nach rrlL-6 induzierte rrC5a in isolierten Hepatocyten die Glykogenphosphorylase in ähnlichem Maße wie 10 h nach rhIL-6.

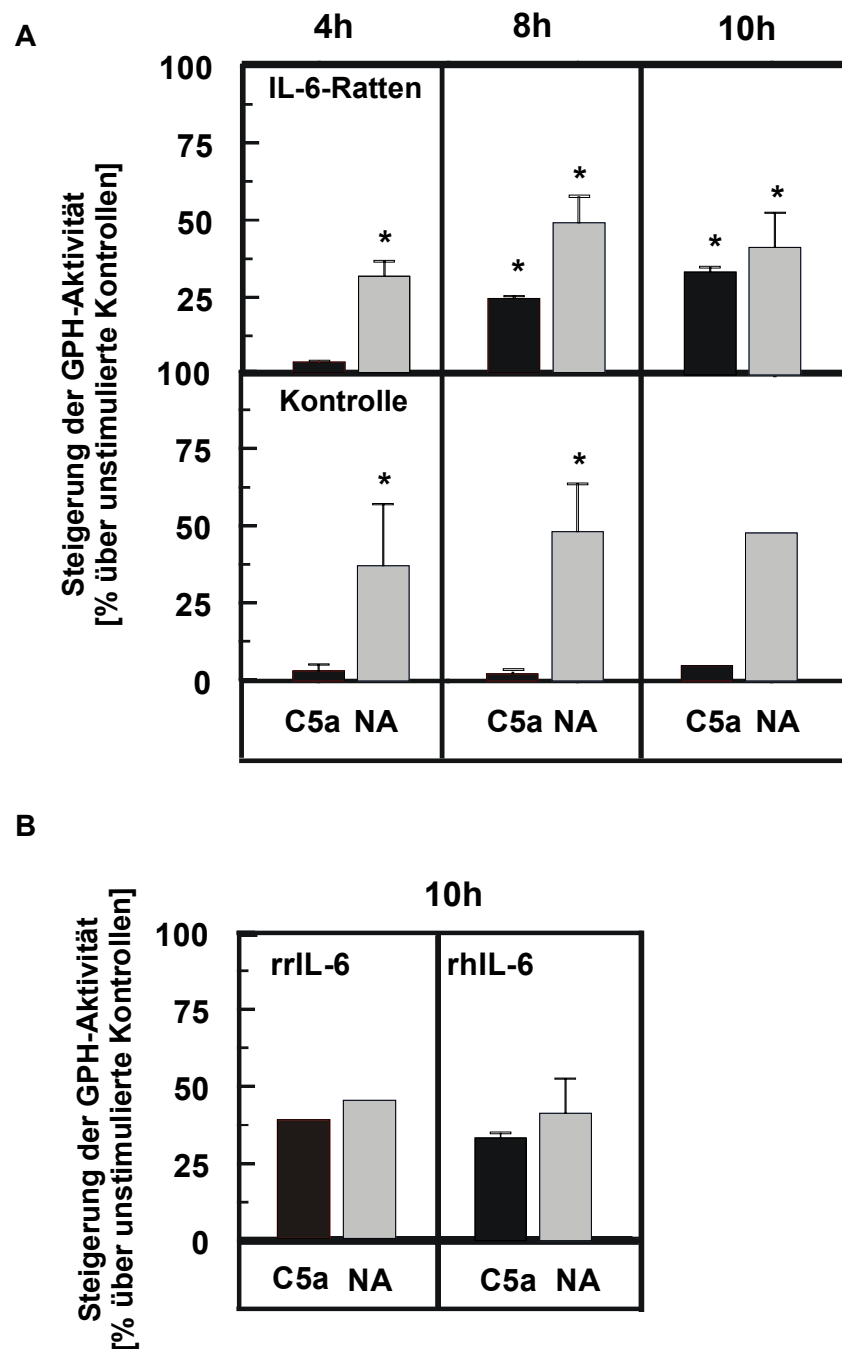


Abb.17: Direkte C5a-abhängige Steigerung der Glykogen-Phosphorylase-Aktivität in frisch isolierten HC nach *in vivo*-Behandlung von Ratten mit IL-6. Die Hepatocyten wurden aus rhIL-6 und unbehandelten Ratten wie in Abb.14 beschrieben präpariert. Nach 15-minütiger Vorinkubation mit 20 μ M Indomethacin wurden die frisch isolierten Hepatocyten mit 1 μ g/ml rrC5a oder 1 μ M NA für 2 min stimuliert. Die G6Pase-Aktivität wurde in den Zellhomogenaten im enzymatischen Test bestimmt und die Steigerung in Prozent über unstimulierten Kontrollen (100%) dargestellt. **(A)** Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ gegenüber unstimulierten Kontrollen (Student's t-Test für ungepaarte Proben). Die Basalwerte für unstimulierte Kontrollen betragen bei den rhIL-6-behandelten Ratten 38 ± 5 nmol/min; 35 ± 3 nmol/min; $31,7 \pm 0,5$ nmol/min; bei den Kontrollratten 35 ± 10 nmol/min, 25 ± 5 nmol/min; 35 nmol/min (jeweils 4, 8 und 10 h - Werte) **(B)** Vergleich der Wirksamkeit von rrIL-6 und rhIL-6-Behandlung.

4.3.5 Direkte Prostanoid-unabhängige Glucose-Freisetzung durch rrC5a in perfundierten Lebern IL-6-behandelter Ratten

Zum Zeitpunkt der maximalen C5aR-Protein-Expression - d.h. 8-10 h nach der Behandlung mit rhIL-6 - wurde eine Leberperfusion wie unter 4.2.5 beschrieben durchgeführt. Dabei war die basale Glucose-Abgabe in Lebern aus rhIL-6-behandelten Ratten höher - jedoch nicht signifikant - als bei den Kontrolltieren (Abb.18).

Wie bereits beschrieben (s. 4.2.5) wurden bei den Kontrolltieren die durch rrC5a ausgelöste Glucose-Abgabe und Fluß-Reduktion durch den Prostanoidsynthese-Inhibitor Indomethacin und den Thromboxan A₂-Rezeptor-Antagonisten Daltroban vollständig gehemmt. Im Gegensatz dazu hatten die Inhibitoren keinen signifikanten Einfluß auf die C5a-abhängige Glucose-Abgabe aus Lebern rhIL-6-behandelter Ratten; auch hier wirkte rrC5a offensichtlich - ebenso wie bei den LPS-behandelten Tieren - direkt auf die Hepatocyten. Die Funktionsfähigkeit der Leber wurde auch hier wie unter 4.2.5 beschrieben durch die Bestimmung der Noradrenalin-abhängigen Glucose-Abgabe und Fluß-Verminderung überprüft; es zeigten sich keine signifikante Unterschiede (nicht gezeigt).

4.4 Fehlende Induktion von C5a-Rezeptoren durch LPS in Hepatocyten aus normaler Rattenleber

Eine direkte Wirkung von LPS auf Hepatocyten ist umstritten (s. Diskussion). Es sollte daher untersucht werden, ob LPS in isolierten kultivierten Hepatocyten eine Expression von C5a-Rezeptoren bewirkt.

4.4.1 Optimierung der Bedingungen zur Kultivierung von primären Rattenhepatocyten

In den ersten Versuchen zeigten kultivierte Hepatocyten anders als frisch isolierte Hepatocyten aus Normalratten eine deutliche basale C5aR-mRNA-Expression. Als Grund hierfür wurde eine Induktion durch Serumfaktoren vermutet, da Hepatocyten während der ersten 4 h nach der Präparation in Anwesenheit von neonatalem Kälberserum (NCS) kultiviert wurden. Eine NCS-freie Anzucht von Hepatocyten ist nur auf collagenierten Platten möglich. Tatsächlich zeigten auf diese Weise kultivierte Hepatocyten keine basale C5aR-mRNA-Expression.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden daher mit Hepatocysten durchgeführt, die in NCS-freiem M199/0,5 nM Insulin/100 nM Dexamethason/1% Antibiotika auf Collagen-beschichteten Platten kultiviert wurden.

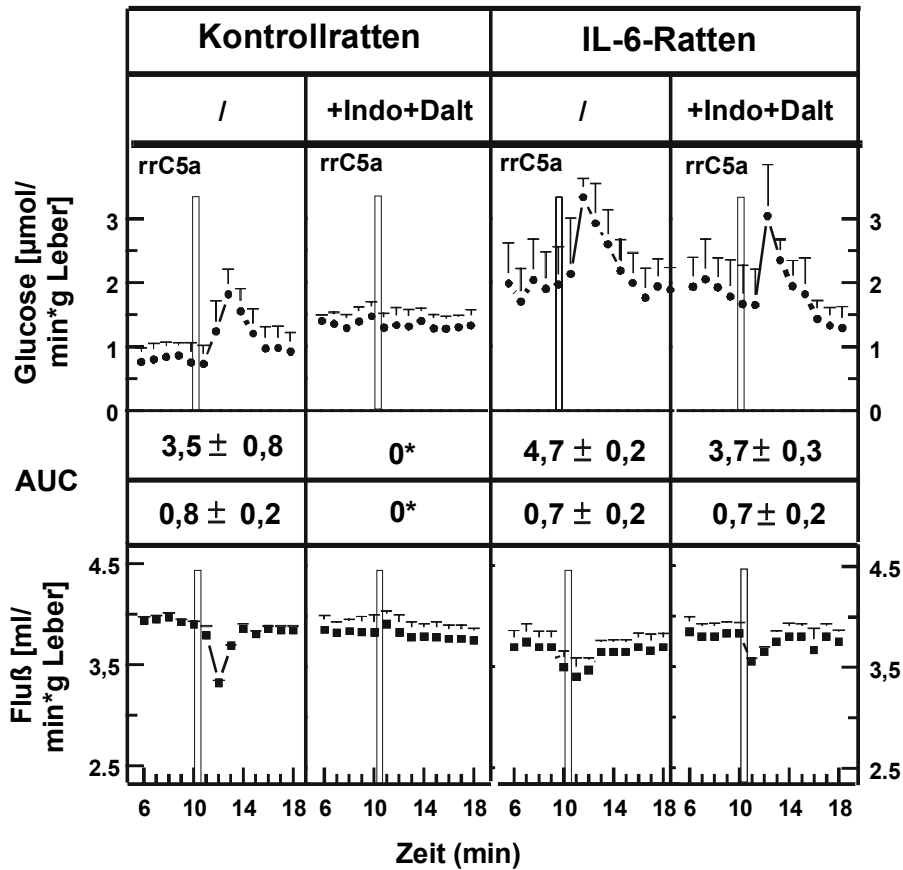


Abb.18: Fehlende Hemmung der C5a-abhängigen Glucose-Freisetzung durch Indomethacin und Daltroban in perfundierten Lebern nach *in vivo*-Behandlung von Ratten mit rhIL-6. Die rhIL-6-Behandlung der Ratten erfolgte wie in Abb.14 beschrieben. Lebern von rhIL-6 behandelten und Kontrollratten wurden 10 h nach der Injektion über die *Vena portae* nicht-rezirkulierend perfundiert. Nach einer 30-minütigen Vorperfusion in Gegenwart oder Abwesenheit von Indomethacin (20 μM) und Daltroban (20 μM) wurden rrC5a (Endkonzentration 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und nach weiteren 10 min NA (Endkonzentration 1 μM) für jeweils 30 s infundiert (Die Ergebnisse der NA-Stimulation werden nicht gezeigt). Proben für die enzymatische Bestimmung der Glucose-Konzentration und Flußraten wurden im 1 min-Takt entnommen. Die Flächen unter den Kurven (AUC) entsprechen $\mu\text{mol}/\text{g Leber}$ für die Glucose bzw. $\text{ml}/\text{g Leber}$ für den Fluß. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 (IL-6 Ratten) und 4 (Kontrollratten) unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ gegenüber Perfusionen ohne Indomethacin und Daltroban (Student's t-Test für ungepaarte Proben). Die Werte für die Kontrollratten wurden aus Schieferdecker et al., 1999 übernommen.

4.4.2 Fehlende Induktion von C5aR-mRNA und -Protein durch LPS in kultivierten Hepatocyten

Zur Untersuchung einer möglichen direkten LPS-abhängigen Induktion von C5a-Rezeptoren wurden HC aus normaler Rattenleber isoliert und nach 24 h für unterschiedliche Zeiträume mit LPS stimuliert. Die C5aR-mRNA-Expression wurde mit RT-PCR wie unter 4.2.2 beschrieben untersucht.

100 ng/ml LPS induzierten in kultivierten Hepatocyten über einen Zeitraum von 48 h keine C5aR-mRNA (Abb. 19). Eine direkte Wirkung von LPS auf die C5aR-Expression in Hepatocyten aus normaler Rattenleber unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte so ausgeschlossen werden.

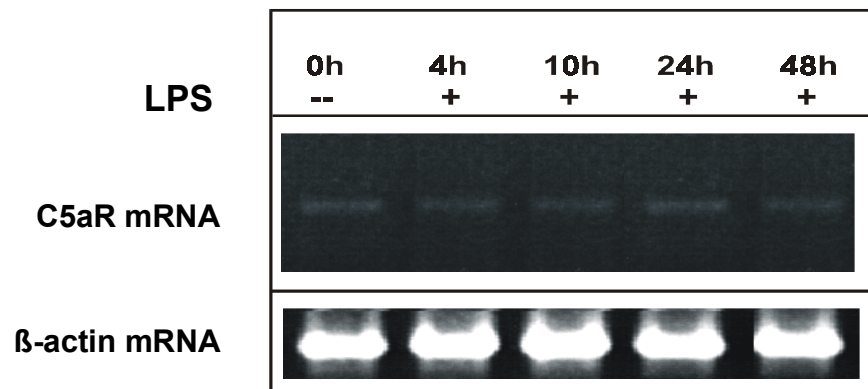


Abb.19: Fehlende Expression von C5aR-mRNA nach *in vitro*-Stimulation mit LPS in kultivierten Hepatocyten. Isolierte Hepatocyten aus normaler Rattenleber wurden 24 h unter Serum-freien Bedingungen auf collagenierten Platten kultiviert und dann für 4 h, 10 h, 24 h und 48 h mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde aus jeweils gleichen Mengen Hepatocyten (2×10^6) Gesamt-RNA isoliert, mit DNase I behandelt und revers transkribiert. Die erhaltene cDNA wurde mittels PCR in Gegenwart von sequenzspezifischen Primern für C5aR (511 bp) oder β-Actin (769 bp) amplifiziert und anschließend elektrophoretisch in 2%-igen Agarosegelen aufgetrennt und nach Anfärbung mit Ethidiumbromid analysiert. Die Abb. 17 zeigt ein repräsentatives von 3 unabhängigen Experimenten.

4.5 Induktion funktioneller C5a-Rezeptoren durch Interleukin-6 und Interleukin-1 β , jedoch nicht durch Tumor-Nekrose-Faktor α in Hepatocyten aus normaler Rattenleber

4.5.1 Induktion von C5aR-mRNA und -Protein durch IL-6 in kultivierten Hepatocyten

Wie in 4.4.2 gezeigt induzierte LPS die C5aR-mRNA *in vitro* in Hepatocyten *in vitro* nicht. Da i) Kupfferzellen nach LPS-Stimulation proinflammatorische Cytokine produzieren [Decker K, 1990] und ii) Hepatocyten die entsprechenden Cytokinrezeptoren exprimieren [Ramadori and Christ, 1999], wurde untersucht, ob das als Hauptentzündungsmediator in der Leber bekannte proinflammatorische Cytokin IL-6 [Ramadori and Christ, 1999] eine Expression von C5a-Rezeptoren in kultivierten Hepatocyten induziert.

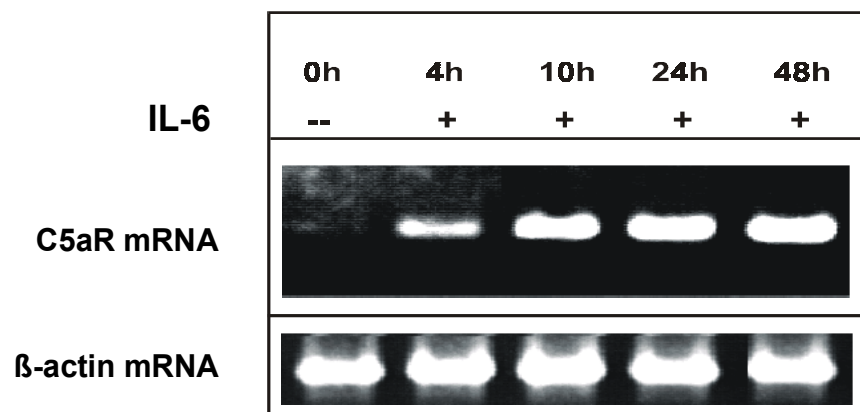


Abb.20: Expression von C5aR-mRNA durch IL-6 in kultivierten Hepatocyten *in vitro*. Die Hepatocyten wurden isoliert und kultiviert sowie die C5aR-mRNA wurde detektiert wie in Abb. 19 beschrieben. Die Zellen wurden für 4 h, 10 h, 24 h and 48 h mit 100 ng/ml rhIL-6 stimuliert. Die Abb. gibt ein repräsentatives von 3 unabhängigen Experimenten wieder.

Hierzu wurden kultivierte Hepatocyten aus normaler Rattenleber für unterschiedliche Zeiträume mit 100 ng/ml rhIL-6 stimuliert. Die C5aR-mRNA-Expression wurde mittels RT-PCR bestimmt. Tatsächlich führte die Stimulation mit rhIL-6 zu einer zeitabhängigen C5aR-mRNA-Expression: bereits 4 h nach der Stimulation war C5aR-mRNA deutlich nachweisbar, das Maximum lag zwischen der 24-ten und der 48-ten Stunde (Abb.20). In unstimulierten Hepatocytenkulturen aus derselben Präparation war zu keinem Zeitpunkt eine C5aR-mRNA nachweisbar (nicht gezeigt).

Auf Protein-Ebene konnte in *in vitro* stimulierten Hepatocyten mittels Durchflußcytometrie bereits nach 4 h eine sehr schwache, nach 10 h und 24 h eine starke C5aR-Protein-Expression nachgewiesen werden (Abb. 21). Nach einer Kulturdauer von insgesamt 72 h begannen die Hepatocyten abzusterben. Aus diesem Grund konnten 48 h

nach Stimulation die Zellen nicht mehr unverletzt von den Platten abgeschabt und für die FACS-Analyse verwendet werden.

Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, daß rhIL-6 *in vitro* die C5aR-Expression in Hepatocyten induziert. IL-6 könnte daher als Mediator der LPS-abhängigen C5aR-Expression in Hepatocyten fungieren.

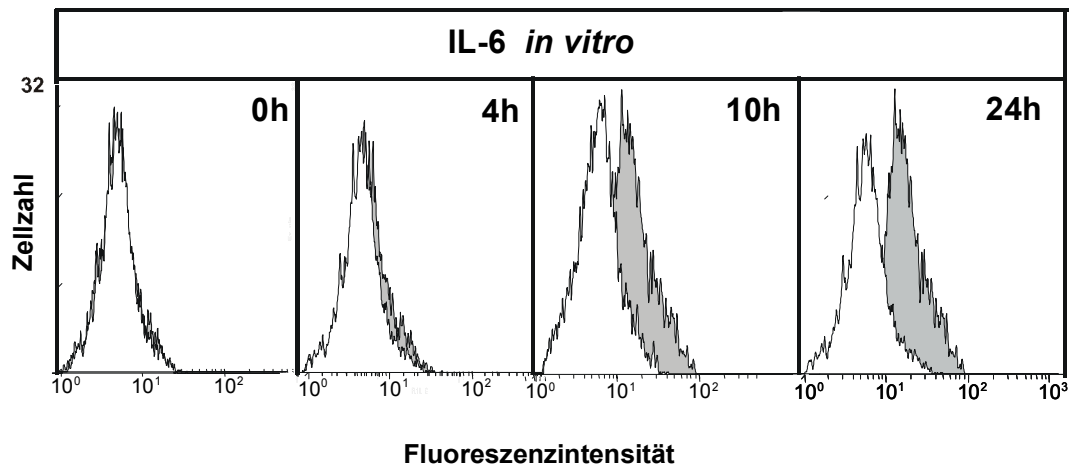


Abb.21: Expression von C5aR-Protein durch IL-6 in kultivierten Hepatocyten *in vitro* (FACS-Analyse). 24 h kultivierte HC (Abb. 19) wurden mit wie in Abb. 20 beschrieben für 4h, 10 h und 24 h mit 100 ng/ml rhIL-6 stimuliert. Nach Ablösung von den Zellkulturschalen wurden die Zellen mit R63 (anti-C5aR mAK) oder MOPC-21 (anti-IgG1-Isotyp-Kontrolle) und anschließend mit FITC-gekoppeltem sekundären Kaninchen - anti-Maus AK inkubiert und durchflußzytometrisch analysiert. Die Fluoreszenz-Intensität für die mit R63 inkubierten HC ist in grau, die Eigenfluoreszenz in weiß dargestellt. Die Abb. 19 zeigt ein repräsentatives von 3 unabhängigen Experimenten.

4.5.2 Induktion von C5aR mRNA- und -Protein Expression durch IL-1 β jedoch nicht durch TNF α in kultivierten Hepatocyten

In 4.4.3. wurde die zeitabhängige Induktion der C5aR-mRNA- und -Protein-Expression durch rhIL-6 in kultivierten Hepatocyten durch rhIL-6 beschrieben. Zum Zeitpunkt der stärksten C5aR-Expression, nämlich nach 24 h Stimulation, wurde die Wirkung der weiteren in der Leber wichtigen proinflammatorischen Cytokine rhIL-1 β und rhTNF α untersucht.

Hierzu wurden 24 h kultivierte Hepatocyten für weitere 24 h mit 10 ng/ml rhIL-1 β bzw. 100 ng/ml rhTNF α stimuliert. RhIL-1 β induzierte eine deutliche C5aR-mRNA-Expression,

deren Stärke mindestens der durch rhIL-6 induzierten entsprach. RhTNF α bewirkte dagegen - wenn überhaupt - nur einen schwachen Anstieg in der C5aR-mRNA-Expression (Abb.20).

Wie auch zuvor wurde die C5aR-Protein-Expression durchflußcytometrisch analysiert. Analog zu den mRNA-Ergebnissen induzierte rhIL-1 β C5aR-Protein deutlich; diese Induktion war ähnlich stark wie nach rhIL-6. Nach 24 h Stimulation mit rhTNF α war dagegen keine oder nur eine äußerst schwache C5aR-Expression nachweisbar. LPS bewirkte keine nachweisbare C5aR-Expression (Abb.23).

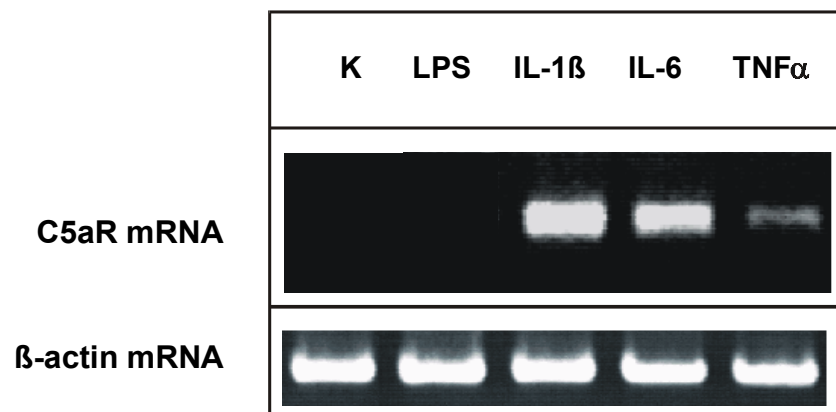


Abb.22: Induktion von C5aR-mRNA durch die proinflammatorischen Cytokine IL-1 β und TNF α in kultivierten Hepatocyten *in vitro*. Die Hepatocyten wurden isoliert und kultiviert sowie die C5aR-mRNA wurde detektiert wie bei Abb. 19 beschrieben. 24 h kultivierte HC wurden dann für weitere 24 h mit 10 ng/ml rhIL-1 β , 100 ng/ml rhIL-6, 100 ng rhTNF α oder 100 ng/ml LPS stimuliert. Als Kontrolle wurden unstimulierten HC aus der gleichen Präparation verwendet. Die Abb.22 zeigt ein repräsentatives von 3 unabhängigen Experimenten

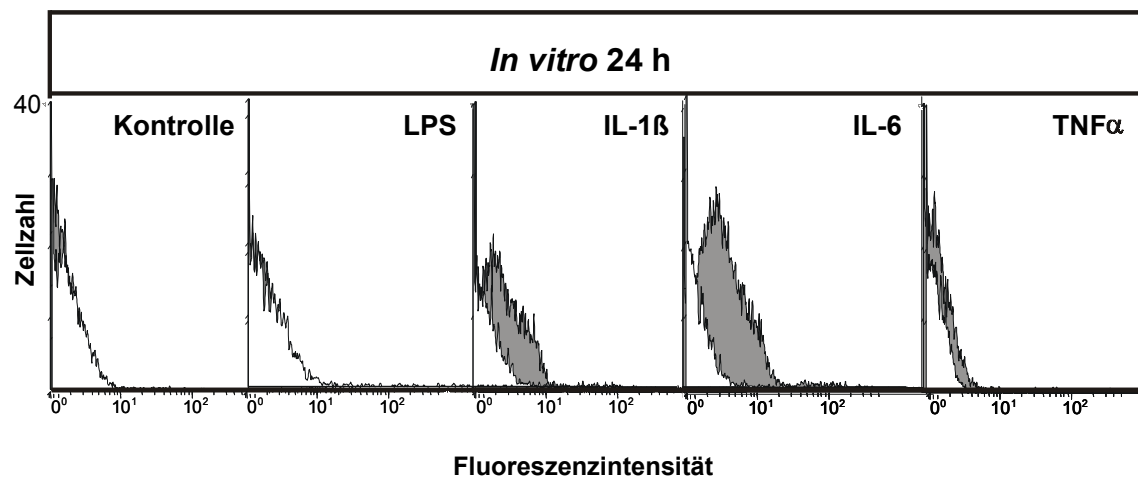


Abb.23: Induktion von C5aR-Protein durch die proinflammatorischen Cytokine IL-1 β und TNF α in kultivierten Hepatocyten *in vitro*. Die Hepatocyten wurden isoliert und kultiviert sowie die C5aR-Protein detektiert wie bei Abb. 1 bzw. 20 beschrieben. 24 h kultivierte HC wurden über weitere 24 h mit 10 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml IL-6, 100 ng/ml TNF α oder 100 ng/ml LPS stimuliert. Als Kontrolle wurden unstimulierten HC aus der gleichen Präparation verwendet. Die Fluoreszenz-Intensität für die mit R63 inkubierten HC sind in grau, die Eigenfluoreszenz in weiß dargestellt. Die Abb.21 zeigt ein repräsentatives aus 2 unabhängigen Experimenten.

4.5.3 Direkte Prostanoid-unabhängige Aktivierung der Glykogenphosphorylase durch C5a in IL-6- und IL-1 β -, jedoch nicht in TNF α - oder LPS-stimulierten Hepatocyten

Um die Funktionsfähigkeit der neu exprimierten C5a-Rezeptoren zu überprüfen, wurde untersucht, ob rrC5a nach *in vitro*-Stimulation mit LPS bzw. mit den proinflammatorischen Cytokinen rhIL-6, rhIL-1 β und rhTNF α in der Lage ist, die hepatocytäre Glykogen-Phosphorylase direkt zu aktivieren. Um eine Beteiligung möglicherweise kontaminierender Nichtparenchymzellen an der Vermittlung der Effekte auszuschließen, erfolgte auch hier die Stimulation in Anwesenheit von 20 μ M Indomethacin.

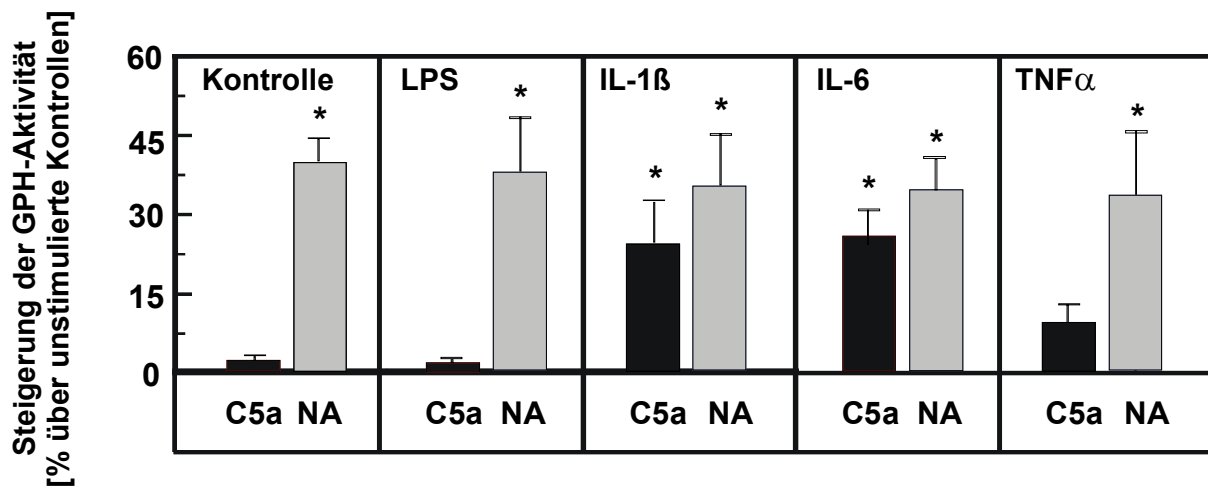


Abb.24: Direkte C5a-abhängige Steigerung der Glykogen-Phosphorylase-Aktivität in kultivierten Hepatocyten nach *in vitro*-Stimulation mit IL-6 und IL-1β, jedoch nicht mit TNFα und LPS. Die Hepatocyten wurden isoliert und kultiviert wie in Abb.19 beschrieben. 24 h kultivierte HC wurden über weitere 24 h mit 100 ng/ml LPS, 10 ng/ml rhIL-1β, 100 ng/ml rhIL-6 bzw. rhTNFα stimuliert. Als Kontrolle wurden unstimulierten Hepatocyten aus der gleichen Präparation verwendet. Nach 15-minütiger Vorinkubation mit 20 μM Indomethacin wurden die Zellen mit 1 μg/ml rrC5a oder 1 μM Noradrenalin für 2 min stimuliert. Die GPH-Aktivität wurde im enzymatischen Test bestimmt und die Steigerung in Prozent über unstimulierten Kontrollen (100%) dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten. * p<0,05, gegenüber internen unstimulierten Kontrollen (Student's t-Test für ungepaarte Proben).

Die Basalwerte für die internen Kontrollen (Glykogen-Phosphorylase-Aktivität pro Platte in μmol/h) betragen bei unstimulierten Hepatocyten $9,8 \pm 0,2$ nmol/min; bei LPS-stimulierten $09,7 \pm 0,3$ nmol/min; bei IL-1β-stimulierten $9,7 \pm 0,3$ μmol/h; bei IL-6-stimulierten $9,7 \pm 0,3$ nmol/min, bei TNFα $9,3 \pm 0,0$ nmol/min.

In unstimulierten sowie in 24 h mit LPS stimulierten Hepatocyten steigerte rrC5a die Glykogenphosphorylase-Aktivität nicht. Dies entspricht den mRNA- und Protein-Expressionsdaten. In IL1-β- sowie in IL-6-behandelten Hepatocyten führte rrC5a zu einer vergleichbar starken Aktivierung der Glykogenphosphorylase (24% bzw. 27% über den unstimulierten Kontrollen). In den mit TNFα stimulierten Hepatocyten war nur eine schwache rrC5a-abhängige Steigerung der Glykogenphosphorylase-Aktivität messbar (10%), die sich von derjenigen der in unstimulierten Hepatocyten nicht signifikant unterschied.

Auch in diesen Versuchen aktivierte Noradrenalin als Positivkontrolle in allen Testgruppen die Glykogenphosphorylase ähnlich stark, knapp 35%, und nicht signifikant unterschiedlich.

5. DISKUSSION

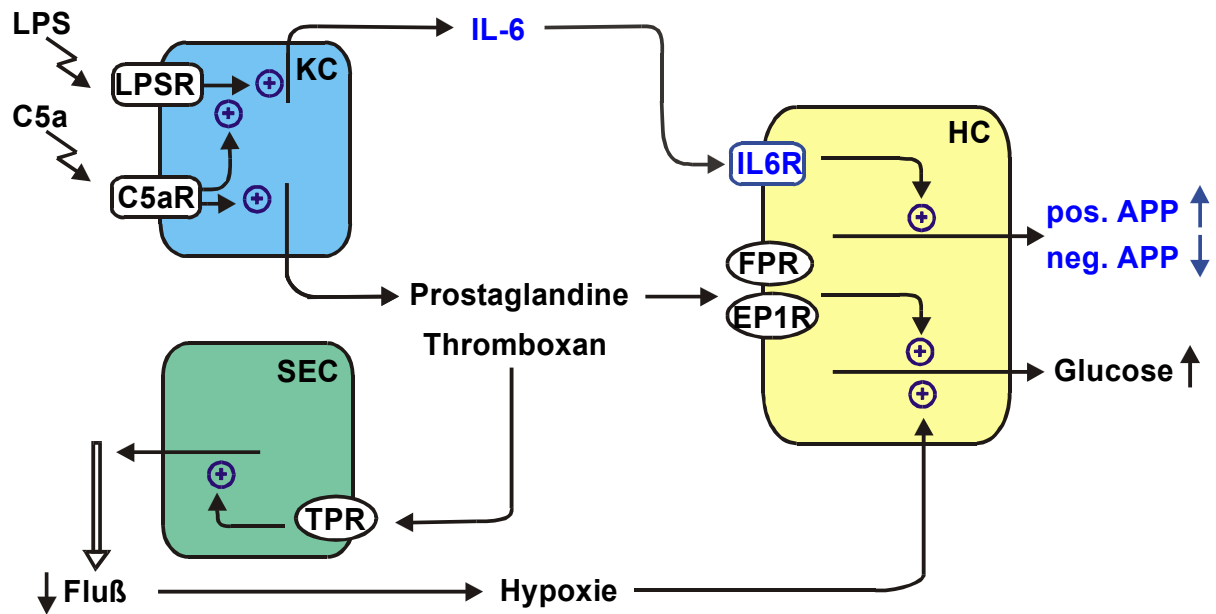
Unter normalen Bedingungen exprimieren Hepatocyten (HC) der Rattenleber keine Rezeptoren für Anaphylatoxin C5a (C5aR) [Schieferdecker et al., 1997; Schlaf et al.1999]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß C5aR-mRNA und-Protein in Hepatocyten unter Entzündungsbedingungen - simuliert durch *in vivo* Behandlung von Ratten mit LPS oder IL6 sowie *in vitro*-Stimulierung kultivierter Hepatocyten mit IL-6 oder IL-1 β - induziert werden. Die *de novo* exprimierten Rezeptoren waren funktionell aktiv: In Hepatocyten aus *in vivo* mit LPS oder IL-6 behandelten Ratten und in Hepatocyten nach *in vitro*-Stimulation mit IL-6 oder IL-1 β , nicht jedoch mit TNF α oder LPS aktivierte rrC5a direkt die Glykogen-Phosphorylase. In perfundierten Lebern aus LPS- und IL-6-behandelten Ratten steigerte rrC5a darüberhinaus direkt, d.h. ohne Vermittlung durch Prostanoiden, die Glucose-Freisetzung (Abb.25). Die Beobachtung, daß LPS *in vivo*, nicht jedoch in kultivierten Hepatocyten *in vitro* C5aR induzierte, spricht für eine indirekte Vermittlung des LPS-Effekts durch andere Mediatoren. Mögliche Kandidaten hierfür sind die *in vitro* wirksamen proinflammatorischen Cytokine IL-6 und IL-1 β .

5.1 Induktion von C5a-Rezeptoren unter verschiedenen pathologischen Bedingungen

Im gesunden Organismus werden Rezeptoren für Anaphylatoxin C5a konstitutiv vorwiegend von Zellen der myeloischen Reihe, d.h. Neutrophilen [Chenoweth and Hugli, 1978], Eosinophilen [Gerard et al., 1989], Basophilen [Kurimoto et al., 1989] und Monocyten exprimiert [Werfel et al., 1992], sowie von sessilen Makrophagen im zentralen Nervensystem (Mikrogliazellen) [Gasque et al., 1995; Lacy et al., 1995] und in der Leber (Kupfferzellen) [Schieferdecker et al., 1997; Schlaf et al., 1999]. In jüngerer Zeit wurde eine konstitutive Expression von C5aR auch für nichtmyeloische Zellen wie humane Astrocyten [Gasque et al., 1995; Lacy et al., 1995], proximal tubuläre Nierenzellen [Zwirner et al., 1999, Fayyazi et al., 2000] sowie für hepatische Sternzellen und - schwach - sinusoidale Endothelzellen der Leber gezeigt [Schieferdecker et al., 1997; Schlaf et al., 1999].

Eine große Zahl von Studien belegt eine vermehrte C5aR-Expression in unterschiedlichen Organen unter pathologischen Bedingungen: So wurden C5aR in humanen Keratinocyten nicht der gesunden, jedoch der entzündeten Haut bei *Lichen planus* und *Pyogenis Granulom* [Fayazzi et al., 1999], in Astrocyten, Microglia und bei allergischer Enzephalomyelitis [Nataf et al., 1998] und Entzündungen des zentralen Nervensystem

Normale Bedingungen (Akute Entzündung)



Pathologische Bedingungen (Subakute Entzündung)

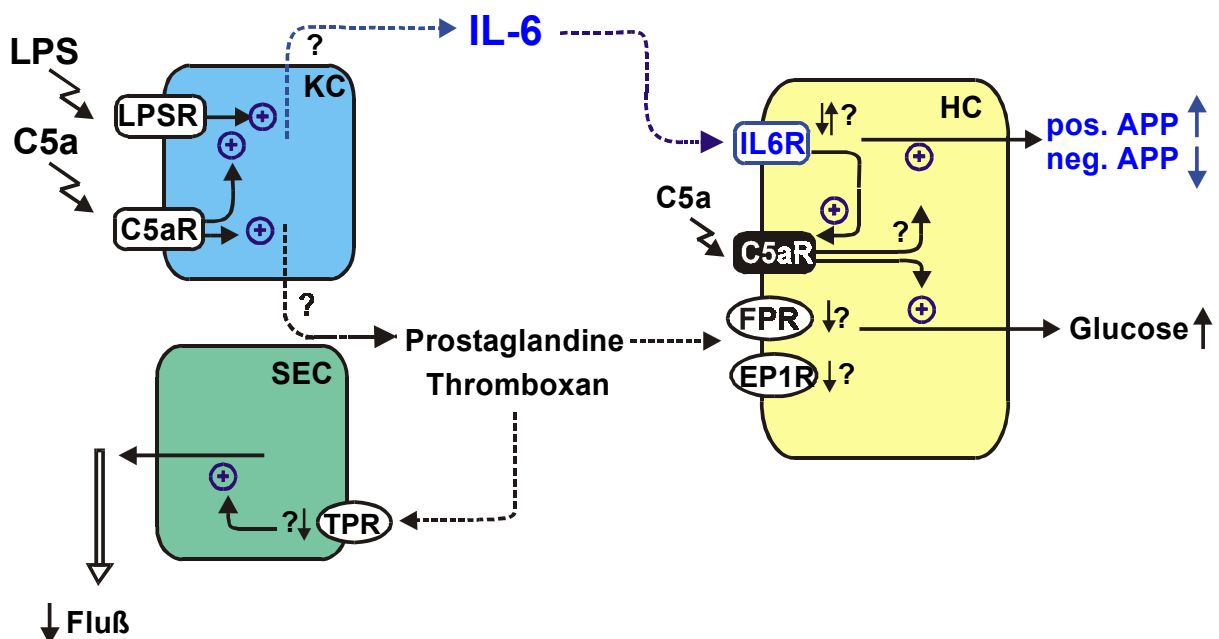


Abb.25: Regulation Anaphylatoxin C5a-abhängiger Abwehrreaktionen in der Leber unter Entzündungsbedingungen (Hypothese). LPS: Lipopolysaccharid; IL-6: Interleukin-6; C5aR: C5a-Rezeptor; IL6R: IL-6-Rezeptor; FÜR: Prostaglandin F2 α -Rezeptor; EP1R: Prostaglandin E2-Rezeptor Subtyp I; HC: Hepatocyten; KC: Kupferzellen; SEC: sinusoidale Endothelzellen.

[Gasque et al., 1997; Osaka et al., 1999], sowie in Neuronen und Gliazellen aus transgenen Mäusen, deren Astrocyten konstitutiv IL-3 produzieren [Paradis et al., 1998], nachgewiesen. C5aR wurden ebenfalls in Neuronen aus Ratten mit Polyneuropathie (diffuse axon injury) [Stahel et al., 1997a], aus Mäusen mit experimenteller *Listeria* Meningoencephalitis [Stahel et al., 1997b] und aus Patienten mit Huntington's disease [Singhrao et al., 1999] detektiert. Weiterhin wurde eine C5aR-Expression in Bronchial-Epithelzellen aus mit *Mycoplasma* infizierten Ratten induziert [Rothermel et al., 2000].

Eine *in vivo*-Behandlung von Mäusen [Haviland et al., 1995] und Ratten [Fukuoka et al., 1998] mit LPS steigerte die C5aR-Expression nicht nur in Milz und Lunge sondern auch in der Leber. Da Hepatocyten die mit Abstand größte Zellfraktion in der Leber repräsentieren, wurde in der vorliegenden Arbeit postuliert, daß die beobachtete vermehrte C5aR-mRNA-Expression zumindest teilweise auf eine *de novo*-Expression in den HC zurückzuführen war. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde daher eine mögliche Induktion des C5aR in Hepatocyten unter verschiedenen Entzündungsbedingungen untersucht.

5.2 Entzündungsmodelle: Experimentelle Simulation von Entzündungen durch LPS als Entzündungsauslöser und Interleukin-6 als Entzündungsmediator

5.2.1 Experimentelle Entzündungen simuliert durch LPS

LPS gilt als einer der stärksten systemischen Entzündungsauslöser, dessen Wirkungen äußerst vielfältig und komplex sind. Als essentieller Bestandteil der äußeren Membran kommensaler sowie pathogener Gram-negativer Bakterien ist LPS auch im gesunden Organismus im peripheren Blut nachweisbar (Plasma-Normalwerte: 3-10 pg/ml) [Alexander und Rietschel, 1999]. Erhöhte systemische LPS-Konzentrationen, z.B. nach einem hämorrhagischen Schock ($66,5 \pm 39,2$ pg LPS/ml) [Jiang et al., 1995] führen zur Aktivierung des Komplementsystems, zur Synthese von pro- und antiinflammatorischen Cytokinen [Barsig et al., 1995], Akut-Phase-Proteinen [Ramadori und Christ, 1999], reaktiven Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid [Laskin et al., 1995] sowie zu weiteren Abwehrreaktionen. Die klinischen Symptome infolge Endotoxämie oder Gram-negativer Sepsis manifestieren sich in Fieber, dramatischem Blutdruckabfall, in intravaskulärer Blutgerinnung sowie schließlich in Multiorganfunktions- und -versagen [Alexander und Rietschel, 1999; Gerard, 1998].

Unterschiedliche Studien beschreiben die Effekte einer *in vivo*-Behandlung von Versuchstieren mit LPS: Die Simulation einer Entzündungssituation durch LPS bewirkte u.a. eine Neutropenie [Short et al., 1999] sowie eine Induktion von Stickstoffmonoxidsynthase

Typ II (iNOS) bzw. von Stickstoffmonoxid (NO) in Rattenaorta und Lunge [Abou Mohamed et al., 1995; Hoque et al., 1998]. In der Leber hatte LPS eine vermehrte Synthese pro- und antiinflammatorischer Cytokine zur Folge [Barsig et al., 1995]. Ebenso verstärkte LPS *in vivo* die Stickstoffmonoxid-Synthese in Kupffer- und sinusoidalen Endothelzellen [Laskin et al., 1995] und steigerte die Expression von Adhäsionsmolekülen in sinusoidalen Endothelzellen [Essani et al., 1995; van Oosten et al., 1995]. Zu den nach LPS *in vivo* beobachteten Effekten gehört auch eine vermehrte Expression von C5aR-mRNA in unterschiedlichen Organen der Maus [Haviland et al., 1995] und der Ratte [Akatsu et al., 1997; Fukuoka et al., 1998] und zwar u.a. in der Leber.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zu den jeweils injizierten LPS-Mengen (s. 4.2.1). In den Studien zur LPS-induzierten C5aR-Expression in der Leber wurden 5-10 µg LPS/g Körpergewicht injiziert [Haviland et al., 1995; Akatsu et al., 1997; Fukuoka et al., 1998]. Diese Dosis war in den eigenen Untersuchungen in 30% der Fälle innerhalb von 10 h lethal. Ein Grund hierfür könnte im Alter der Versuchstiere liegen, da aus Kostengründen kleinere (120-180 g), das heißt sehr junge Tiere (8-10 Wochen) verwendet wurden. Da bereits eine nicht-letale Dosis von 3 µg LPS/g Körpergewicht eine ausgeprägte Akut-Phase-Reaktion verursacht [Jepson et al., 1986], wurden in weiteren Versuchen 2,5 µg LPS/g Körpergewicht injiziert. Dies steigerte die Überlebensrate auf 100% (s. 4.2.1).

5.2.2 Experimentelle Entzündungen simuliert durch IL-6

Das proinflammatorische Cytokin IL-6 ist ein prominenter Entzündungsmediator und Hauptinduktor hepatocytärer Abwehrreaktionen [Ramadori and Christ, 1999; Baumann and Gauldie, 1994; Heinrich et al., 1990; Castell et al., 1989]. Die Normalwerte in humanem Serum betragen $2,1 \pm 0,1$ pg IL-6 /ml [Straub et al., 2000] gegenüber bis zu 1000 pg/ml bei Sepsis [Tschaikowsky et al., 2000].

Während andere proinflammatorische Cytokine (IL1 β , TNF α) *in vivo* eine extreme Toxizität besitzen, werden höhere IL-6-Konzentrationen vom Organismus toleriert: Injektion von IL-1 β und TNF α in Säugetieren verursachen Schock auch in Abwesenheit von LPS oder Bakterien [Barton, 1996]. Eine IL-6-Behandlung dagegen führte in Mäusen [Neta et al., 1988], Hunden [Preister et al., 1991] und Primaten [Asano et al., 1990] "nur" zu für die Akut-Phase-Reaktion typischen Symptomen wie Fieber und Synthese von Akut-Phase-Proteinen durch Hepatocyten [Akira et al., 1993, Barton, 1996], jedoch zu keinem Schock.

Nach LPS-Stimulation wird IL-6 aus Monocyten/Makrophagen, Fibroblasten, Osteoblasten, vaskulären Endothelzellen und - in der Leber - aus Kupfferzellen freigesetzt [Helfgott et al., 1987; Decker, 1990; Akira et al., 1993, Barton, 1996]. Es ist bekannt, daß nach LPS-Behandlung IL-6 sowohl systemisch [Mascagni et al., 2000; Yassad et al., 2000]

als auch lokal in der Leber [Luster et al., 1994] freigesetzt wird und Hepatocyten Rezeptoren für IL-6 exprimieren [Bauer et al., 1989], über die u.a. die Synthese von Akut-Phase-Proteinen stimuliert wird [Ramadori and Christ, 1999; Baumann and Gaudie, 1994; Heinrich et al., 1990]. Daher ist IL-6 ein höchstgeeigneter Kandidat für die Rolle eines möglichen Mediators der LPS-abhängigen C5aR-Expression in den Hepatocyten.

In der Literatur ist beschrieben, daß eine *in vivo*-Behandlung von Ratten mit 0,035-0,120 µg IL-6/g Körpergewicht eine vermehrte Synthese von Akut-Phase-Proteinen bewirkt [Marinkovic et al., 1989; Geiger et al., 1988]. Aufgrund früherer Untersuchungen zur IL-6-abhängigen Induktion von α_2 -Macroglobulin in der Rattenleber [B. Lienenlücke, Diplomarbeit] wurde für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vivo*-Experimente eine Konzentration von 0,02 µg IL-6/g Körpergewicht gewählt. Dabei wurden bei den Versuchstieren bis zu 30 h nach der Injektion nur leichtes Fieber und Müdigkeit beobachtet, jedoch keine Todesfälle. Bezüglich der Induktion von C5aR in Hepatocyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Wirksamkeit von rhIL-6 und rrIL-6 (Abb. 12c, 15b). Dies bestätigt die Wirksamkeit von rhIL-6 in der Ratte [Christ et al., 2000; Taga et al., 1997].

5.3 Induktion von C5a-Rezeptoren in Hepatocyten der Rattenleber unter experimentellen Entzündungsbedingungen

Die *in vivo*-Behandlung von Ratten sowohl mit LPS als auch mit IL-6 induzierte die Expression von C5aR-mRNA und -Protein in den unter Normalbedingungen C5aR-freien Hepatocyten. Die Kinetiken waren nach LPS bzw. IL-6 ähnlich: In beiden Fällen war C5aR-mRNA bereits 2 h nach der Injektion nachweisbar. Während das Maximum der Expression schon 4 h nach IL-6 erreicht war (Abb.14), nahm die C5aR-mRNA-Expression noch bis zu 10 h nach der LPS-Behandlung deutlich zu (Abb.9). Sowohl nach LPS als auch nach IL-6 war die C5aR-Protein-Expression 8 h -10 h nach der Behandlung maximal (Abb. 10, 15).

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Kinetiken der C5aR-mRNA-Expression nach LPS bzw. IL-6 ist möglicherweise im Mechanismus der Signalvermittlung zu suchen. Während IL-6 über entsprechende Rezeptoren direkt die Hepatocyten stimulieren kann [Bauer et al., 1989], wirkt LPS mit großer Wahrscheinlichkeit nur indirekt. LPS bewirkt die Freisetzung nicht nur von IL-6, sondern auch von anderen proinflammatorischen Cytokinen und eventuell weiteren Mediatoren aus myeloischen Zellen wie Peritonealmakrophagen [Mascagni et al., 2000; Yassad et al., 2000] und auch Kupferzellen [Luster et al., 1994]. Einer oder mehrere dieser nach LPS freigesetzten Faktoren induziert C5aR möglicherweise mit einer gegenüber IL-6 leicht verzögerten Kinetik. Während injiziertes IL-6 durch verschiedene Mechanismen schnell abgebaut wird [Castell et al., 1989], verstärken nach LPS sezerniertes IL-1 β und

TNF α autokrin die IL-6-Produktion [Barton, 1996]. Wahrscheinlich ist diese „zweite Welle“ von IL-6 eine weitere Ursache für das spätere Maximum der C5aR-mRNA nach LPS.

In Hepatocyten, die 4-8 h nach der Injektion aus den mit NaCl/RSA gespritzten Kontrollratten isoliert wurden, konnte in einigen Fällen eine schwache C5aR-mRNA-Expression beobachtet werden. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen Stress-bedingten Anstieg in der C5aR-Expression zurückzuführen. In keinem Fall wurde in Hepatocyten aus Kontrolltieren funktionelles Protein nachgewiesen.

5.4 Vermittlung des LPS-Effektes

5.4.1 Fehlende direkte Wirkung von LPS auf die C5aR-Expression in Hepatocyten

Um zu klären, ob LPS direkt auf die Hepatocyten wirkt, wurde die C5aR-Expression auch nach *in vitro*-Stimulation isolierter Hepatocyten aus normaler Rattenleber mit LPS untersucht. Weder C5aR-mRNA noch -Protein waren in bis zu 48 h mit 100 ng/ml LPS stimulierten Hepatocyten detektierbar (Abb.19, 23). Auch höhere LPS-Konzentrationen von 1 μ g/ml hatten keinen Effekt (nicht gezeigt). Dies ist in Einklang mit früheren Befunden, die zeigten, daß 100 ng/ml LPS in kultivierten Hepatocyten nicht direkt, sondern nur indirekt durch das aus Kupferzellen nach LPS-Stimulierung freigesetzte proinflammatorische Cytokin IL-6 α_2 -Makroglobulin-mRNA-Expression induzierte [Mäck et al., 1999].

Einige wenige andere Untersuchungen beschreiben direkte LPS-Effekte auf isolierte Hepatocyten nach *in vitro*-Stimulation wie die Synthese von Cytokinen [Saad et al., 1995; Panesar et al. 1999] und reaktiven Sauerstoffspezies [Diaz-Guerra et al., 1996] Diese Effekte wurden mit LPS-Konzentrationen von über 1 μ g/ml erzielt, die weit über den physiologisch [Arai et al., 1998; Pillay et al., 1997] aber auch pathophysiologisch [Jiang et al., 1995; Yano et al., 1999] im Pfortaderblut nachweisbaren Konzentrationen im pg/ml bzw. ng/ml-Bereich liegen. Außerdem ist nicht auszuschließen, daß die LPS-Wirkungen auf kontaminierende Kupferzellen oder vor allem Perisinusoidalzellen in den Hepatocytenpräparationen zurückzuführen sind.

Die fehlenden direkte Effekte von LPS auf die Hepatocyten werden gestützt durch die Beobachtung, daß Hepatocyten den „klassischen“ LPS-Rezeptor, CD14 nicht oder nur äußerst schwach exprimieren [Liu et al., 1998]. Obwohl verschiedene andere Moleküle als LPS-Rezeptoren diskutiert werden [Wright et al., 1989; Hampton et al., 1991], ist CD14 - gemeinsam mit Toll-like receptor-4 bzw. 2 als Signalvermittler (s. Einleitung) - der am weitesten verbreitete LPS-Rezeptor [Chow et al., 1999; Kirschning et al., 1998]. Mögliche direkte Effekte von LPS auf Hepatocyten könnten also nur CD-14-unabhängig erfolgen.

5.4.2 Direkte Induktion von C5a-Rezeptoren in Hepatocyten durch IL-6 und IL-1 β

Im Gegensatz zu LPS induzierte IL-6 sowohl in Versuchstieren *in vivo* (Abb. 14, 15, 16) als auch in isolierten Hepatocyten *in vitro* (Abb. 20, 21) die Expression von C5a-Rezeptoren. Der *in vitro*-Befund spricht dafür, daß auch der *in vivo*-Effekt von IL-6 auf eine direkte Wirkung auf die Hepatocyten zurückzuführen war. Allerdings unterschieden sich die Kinetiken der C5aR-Expression nach IL-6 *in vivo* bzw. *in vitro* sehr deutlich: Das Maximum der C5aR-mRNA-Expression war nach IL-6 *in vivo* bereits nach 4 h erreicht (Abb. 14), nach *in-vitro*-Stimulation dagegen erst nach 24-48 h (Abb. 20). Eine mögliche Ursache hierfür ist, daß das injizierte IL-6 im Organismus relativ schnell abgebaut wird: rhIL-6 - ¹²⁵I-markiert und i.v. appliziert - wird aus der Zirkulation mit biphasischer Kinetik entfernt: in der ersten Phase werden innerhalb von 3 min ca. 42% der Ausgangsmenge abgebaut, in der langsameren zweiten Phase zeigt rhIL-6 eine Halbwertszeit von 55 min [Castell et al., 1989]. Die Halbwertszeit in Kultur dagegen beträgt 12-18 Stunden (Herstellerebene).

Neben IL-6 spielen auch weitere proinflammatorische Cytokine wie IL-1 β und TNF α eine entscheidende Rolle für die Regulation hepatischer Abwehrreaktionen. Wegen der hohen Toxizität dieser Cytokine *in vivo* [Barton, 1996] wurden IL-1 β und TNF α nur in *in vitro*-Experimenten eingesetzt. Während IL-1 β ebenso wie IL-6 C5aR induzierte, hatte TNF α keinen signifikanten Einfluß (Abb. 20, 21). Hepatocyten exprimieren Rezeptoren für alle drei proinflammatorischen Cytokine [Bauer et al., 1989; Ito et al., 1999; Adamson et al., 1994]; diese wirken zum Teil über die gleichen, zum Teil aber auch über unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden (s. Einleitung). Dementsprechend regulieren die verschiedenen Cytokine unterschiedliche Effektorfunktionen von Hepatocyten [Ramadori and Christ, 1999; Liu et al., 1998; Cortez-Pinto et al., 1998; Rizzardini et al., 1998; Ito et al., 1997]. Der Promotor des C5aR-Gens ist bislang nicht charakterisiert; Aussagen über mögliche Cytokin-responsible Elemente und additive *in vivo*-Wirkungen von IL-6 und IL-1 β auf die C5aR sind daher nicht möglich.

5.4.3 Mögliche Vermittlung der LPS-stimulierten C5aR-Expression durch LPS-abhängige Freisetzung proinflammatorischer Cytokine aus Kupfferzellen

Da bekannt ist, daß LPS die proinflammatorischen Cytokine IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ aus zirkulierenden [Ensor JE et al., 1994] und IL-6, IL-1 β und $\text{TNF}\alpha$ aus Peritonealmakrophagen [Mascagni et al., 2000; Yassad et al., 2000] sowie auch aus Kupfferzellen freisetzt [Luster et al., 1994], und IL-6 und IL-1 β C5aR in Hepatocyten induzierten (Abb. 18, 19, 20), liegt die Vermutung nahe, daß die durch LPS *in vivo* induzierte C5aR-Expression durch IL-6 und/oder IL-1 β vermittelt wurde.

Aus den vorliegenden Daten kann jedoch weder geschlossen werden, daß diese Cytokine tatsächlich als hauptsächliche Vermittler des LPS-Effektes fungieren, noch welche Zellen *in vivo* Zielzellen für LPS und damit Quelle für die vermittelnden Mediatoren sind. Um die Frage nach einer tatsächlichen Beteiligung von IL-6 an der Vermittlung des LPS-Effektes zu klären, müsste die *in vivo*-Behandlung der Ratten mit LPS in Gegenwart inhibierender anti-IL-6-Antikörper erfolgen.

Ebenso läßt sich die Frage nach der/den Zielzelle(n) für LPS nur mit großen Schwierigkeiten klären. Im Organismus gibt es eine Vielzahl von Makrophagenpopulationen, die als Vermittler möglich wären. Für eine Beteiligung von Kupfferzellen spricht, daß i) LPS nach i.p. Behandlung der Ratten sehr schnell über die Pfortader die Leber erreicht und ii) die Kupfferzellen die größte Makrophagen-Population des Organismus darstellen. Tatsächlich konnte in ersten Vorversuchen gezeigt werden, daß LPS in Kupfferzellen /Hepatocyten Kokulturen IL-6-abhängig C5aR in Hepatocyten induziert. Ob Kupfferzellen tatsächlich auch *in vivo* eine Hauptquelle für IL-6 und/oder andere Faktoren sind, ließe sich klären durch LPS-Behandlung von Tieren, deren Kupfferzellen durch Vorbehandlung mit Gadoliniumchlorid funktionell depletiert wurden [Puschel et al., 1996].

5.5 Bedeutung der *de novo* C5a-Rezeptor-Expression in Hepatocyten für die Regulation von Abwehrreaktionen

Eine wichtige Aufgabe der Leber bei pathologischen Zuständen ist eine vermehrte Glucose-Freisetzung aus den Glykogen-speichernden Hepatocyten. Die Glucose dient zur Deckung des erhöhten Energie-Bedarfs im Entzündungsgebiet, sowie als Elektronen-Donor für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies.

In den ersten Phasen einer Entzündungsreaktion ist die Leber immer noch in ihrem normalen Zustand; die Hepatocyten exprimieren keine C5a-Rezeptoren [Schieferdecker et al., 1997; Schlaf et al., 1999] (Abb.25). Trotzdem konnte das bei der Aktivierung des Komplementsystems entstandene Anaphylatoxin C5a wichtige Hepatocyten-spezifische Abwehr-

reaktionen wie eine vermehrte Glucose-Freisetzung [Schieferdecker et al., 1999; Püschel et al., 1996] aber auch eine veränderte Synthese von Akut-Phase-Proteinen [Mäck et al. 1999] regulieren. Diese Effekte wurden jedoch ausschließlich indirekt vermittelt, und zwar durch Prostanoiden im Falle der Glucose-Freisetzung [Schieferdecker et al., 1999; Püschel et al., 1996], bzw durch Cytokine im Falle der Akut-Phase-Proteine-Synthese [Mäck et al. 1999]. Quelle für diese Mediatoren waren die C5aR-exprimierenden Nichtparenchymzellen (Abb.25). Mit Hilfe von Hemmstoffen des Prostanoid-Stoffwechsels konnte gezeigt werden, daß der Stoffwechsel-Effekt von C5a indirekt durch Prostanoid bewirkt wurde [Schieferdecker et al., 1999; Püschel et al., 1996]. Aus der Beobachtung, dass nach Vorbehandlung von Ratten mit Gadoliniumchlorid, das eine funktionelle Depletion von Kupfferzellen verursacht [Püschel et al., 1996], der C5a-abhängige Prostanoid-Überlauf in der perfundierten Leber sowie die Glucose-Abgabe signifikant, nicht aber vollständig gehemmt waren [Püschel et al., 1996], wurde geschlossen, dass neben Kupfferzellen noch weitere Nichtparenchymzellen über C5a-induzierte Prostanoid-Freisetzung an der Vermittlung des C5a-Effekts beteiligt waren. Tatsächlich aktivierte rrC5a die hepatozytäre Glykogen-Phosphorylase nicht nur in KC/HC-Kokulturen [Hespeling et al., 1995], sondern auch in Kokulturen von Hepatocyten mit Perisinusoidalzellen [Schieferdecker et al., 1998], die ebenso wie Kupfferzellen C5a-Rezeptoren exprimieren [Schieferdecker et al., 1997].

Anders als in Hepatocyten aus normaler Rattenleber steigerte rrC5a in frisch isolierten Hepatocyten aus LPS- sowie aus IL-6-behandelten Ratten direkt die Glykogen-Phosphorylase-Aktivität. Auch in perfundierten Lebern aus LPS- oder IL-6-behandelten Tieren erhöhte rrC5a direkt die Glucose-Abgabe: In Leberperfusionen, die 8 h nach Behandlung der Ratte mit LPS bzw. IL-6 durchgeführt wurden, war der C5a-induzierte Glucose-Anstieg - anders als in perfundierten Lebern gesunder Ratten [Schieferdecker et al., 1997] - nicht durch den Prostanoid-Synthese Inhibitor Indomethacin und den Thromboxan A₂-Rezeptor-Antagonist Daltroban inhibierbar (Abb.11, 16).

Neben der vermehrten Glucose-Freisetzung war auch die C5a-abhängige Fluß-Reduktion durch die Hemmstoffe in den perfundierten Lebern aus Normalratten, nicht jedoch in denen aus behandelten Tieren aufgehoben (Abb.11, 16). Für die Normalsituation konnte gezeigt werden, daß die C5a-abhängige Flußreduktion vorwiegend durch Thromboxan vermittelt wird, das nach C5a-Stimulation aus Kupfferzellen [Hespeling et al., 1995] und Perisinusoidalzellen [Schieferdecker et al., 1998] freigesetzt wird und dann eine Kontraktion mit großer Wahrscheinlichkeit der Thromboxan-Rezeptor-exprimierenden sinusoidalen Endothelzellen [Fennekohl et al., 1999] bewirkt [Schieferdecker et al., 1999]. Da in den "entzündeten" Lebern auch der Flußeffect von C5a nicht durch Indomethacin und Daltroban hemmbar war, scheint C5a hier auch direkt die Kontraktion der sinusoidalen Endothelzellen zu bewirken. Dies deckt sich mit Beobachtungen, daß durch IL-6 *in vivo* eine vermehrte C5aR-Expression auch in sinusoidalen Endothelzellen induziert wurde [unveröffentlicht].

Durch die *de novo*-Expression funktioneller C5a-Rezeptoren in Hepatocyten können Effektorfunktionen dieser Zellen wie die erhöhte Glucose-Freisetzung und möglicherweise auch die vermehrte Akut-Phase-Proteine-Synthese anders als in der Normalsituation direkt durch C5a reguliert werden (Abb.25). Dies scheint zum einen ökonomischer für die Leber und beschleunigt möglicherweise Abwehrreaktionen in den späteren Phasen einer Entzündung, zum anderen eröffnet es die Möglichkeit anderer Regulationsmechanismen: So könnten pro- und anti-inflammatorische Cytokine und Prostaglandine, die in der Entzündungssituation möglicherweise mit anderem Spektrum aus Nichtparenchymzellen freigesetzt werden, die direkten C5a-Effekte kostimulatorisch oder inhibitorisch modulieren.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Induktion von C5a-Rezeptoren durch LPS, IL-6 und IL-1 β in Hepatocyten und deren funktionelle Konsequenzen unterstützen die entscheidende Rolle von Anaphylatoxinen für die Regulation hepatischer Abwehrreaktionen.

LITERATURVERZEICHNIS:

Abou Mohamed G, Papapetropoulos A, Ulrich D, Catravas JD, Tuttle RR, Caldwell RW (1995) HP-228, a novel synthetic peptide, inhibits the induction of nitric oxide synthase *in vivo* but not *in vitro*. J Pharmacol Exp Ther 275: 584-591

Adamson GM, Billings RE (1994) Tumor necrosis factor: receptor binding and expression of receptors in cultured mouse hepatocytes. J Pharmacol Exp Ther 269: 367-373

Akatsu H, Miwa T, Sakurada C, Fukuoka Y, Ember JA, Yamamoto T, Hugli TE, Okada H (1997) cDNA cloning and characterization of rat C5a anaphylatoxin receptor. Microbiol Immunol 41: 575-580

Akira S, Taga T, Kishimoto T (1993) Interleukin-6 in biology and medicine. Adv in Immunol 54: 1-78

Alexander C und Rietschel ET (1999) Bakterielle Lipopolysaccharide - Hochaktive Stimulatoren der angeborenen Immunität. Biospektrum 4: 275-281

Amatruda TT, Gerard NP, Gerard C, Simon M (1993) Specific interactions of chemoattractant factor receptors with G-proteins. J Biol Chem 268: 10139-10144

Anthony R, Morrison L, Mac Sween 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

Asano S, Okano A, Ozawa K, Nakahata T, Ishibashi T, Koike H, Kimura H, Tanioka Y, Shibuya A, Hirano T, Kishimoto T, Takaku F, Akiyama Y (1990) *In vivo* effects of recombinant human interleukin-6 in primates: Stimulated production of platelets. Blood 75: 1602-1605

Banauch D, Brümmer W, Ebeling E, Metz H., Rindfrey H, Lang H, Leybold K, Rick W (1975) Eine Glucose-Dehydrogenase für die Glucose-Bestimmung in Körperflüssigkeiten. Z Klein Chem Klein Biochem 13: 101-107

Barsig J, Kusters S, Vogt K, Volk HD, Tiegs G, Wendel A (1995) Lipopolysaccharide-induced interleukin-10 in mice: role of endogenous tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* 25: 2888-2893

Bartalena L, Grassol L, Brogioni S, Martino E (1994) Interleukin-6 effects on the pituitary-thyroid axis in the rat. *Eur J Endocrinol* 131: 302-6

Barton BE (1996) The biological effects of Interleukin-6. *Med Res Rev* 16: 87-109

Bauer J, Lengyel G, Bauer TM, Acs G, Gerok W (1989) Regulation of interleukin-6 receptor expression in human monocytes and hepatocytes. *FEBS Lett* 249: 27-30

Baumann H, Gauldie J (1994) The acute phase response. *Immunol Today* 15: 74-80

Bellezo 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

Bemelmans MH, Van Tits LJ, Buurman WA (1996) Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Crit Rev immunol* 16: 1-11

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

Blouin A (1977) Morphometry of liver sinusoidal cells; Wisse E, Knook PL (eds.): Kupffer cells and other liver sinusoidal cells. Elsevier, Holland 61-71

Boraschi D, Bossu P, Macchia G, Ruggiero P, Tagliabue A (1995) Structure-function relationship in the IL-1 Family. *Front in Bioscience* 1: 270-308

Bouwens L, De Bleser P, Vanderkerken K, Geerts B, Wisse E (1992) Liver cell heterogeneity: Functions of non-parenchymal cells. *Enzyme* 46: 155-168

Braun M, Davis AE (1998) Cultured human mesangial cells express the C5a receptor. *Kidney Int* 54: 1542-1549

Buchner RR, Hugli TE, Ember JA and Morgan EL (1995) Expression of functional receptors for human C5a anaphylatoxin (CD88) on the human hepatocellular carcinoma cell line

HepG2. Stimulation of acute-phase protein-specific mRNA and protein synthesis by human C5a anaphylatoxin. *J Immunol* 155, 308-315

Buddecke D (1984) *Grundriss der Biochemie*, 7. Neubearb. Aufl., Berlin; de Gruyter

Burt AD, Path MRC, Le Bail B, Balabaud C, Bioulac-Sage P (1993) Morphological investigation of sinusoidal cells. *Semin Liver Dis* 13: 21-39

Busam KJ, Bauer TM, Bauer J, Gerok W, Decker K (1990) Interleukin 6 release by rat liver macrophages. *J Hepatol* 11: 367-373

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Greens S, Fiore N, Williamson B (1975) An endotoxin-induced factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3666-3670

Castell JV, Geiger T, Gross V, Andus T, Walter E, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC (1988) *Eur J Biochem* 177, 357-361

Castell JV, Andus T, Kunz D, Heinrich PC (1989) The major regulator of acute-phase protein synthesis in man and rat. *Ann NY Acad Sci* 557: 87-99

Ceretti DP, Kozlosky 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

Chenoweth DE and Hugli TE (1978) Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leucocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 3943-3947

Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WG, Gusovsky F (1999) Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 274 (16): 10689-10692

Christ B, Yazici E, Nath-A (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C contribute to the inhibition by interleukin 6 of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in cultured rat hepatocytes. *Hepatology* 31: 461-468

Cortez-Pinto H, Yang SQ, Lin HZ, Costa S, Hwang CS, Lane MD, Bagby G, Diehl AM (1998) Bacterial lipopolysaccharide induces uncoupling protein-2 expression in hepatocytes by a

tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 313-9

Cui L, Carney DF, Hugli TE (1994) Primary structure and functional characterization of rat C5a: an anaphylatoxin with unusual high potency. *Prot Sci* 3: 1169-1177

Decker K (1990) Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur.J. Biochem* 192: 245-261

Diaz-Guerra MJM; Velasco M, Martin-Sanz P, Bosca L (1996) Evidence for common mechanisms in the transcriptional control of type II nitric oxide synthase in isolated hepatocytes. Requirement of NF-kappaB activation after stimulation with bacterial cell wall products and phorbol esters. *J Biol Chem* 271: 30114-30120

Eisen HN (1990) *General Immunology* (Rev. ed. of *Immunology*. 2nd ed.) by JB Lippincott Company, Philadelphia, PA

Ensor JE, Wiener SM, McCrea KA, Viscardi RM, Crawford EK, Hasday JD (1994) Differential effects of hyperthermia on macrophage interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha expression. *Am-J-Physiol* 266: 967-974

Essani NA, Fisher MA, Farhood A, Manning AM, Smith CW, Jaeschke H (1995) Cytokine-induced upregulation of hepatic intracellular adhesion molecule-1 messenger RNA expression and its role in the pathophysiology of murine endotoxin shock and acute liver failure. *Hepatology* 21:1631-1639

Fantuzzi-Giamilia GK, Harding MW, Livingston DJ (1999) Response to local inflammation of IL-1 β -converting enzyme-deficient mice. *J Immunol* 158: 1818-1824

Farkas I, Baranyi L, Takahashi M, Fukuda A, Liposits Z, Yamamoto T, Okada H. (1998) A neuronal C5a receptor and an associated apoptotic signal transduction pathway. *J. Physiol.* 507: 679-687

Fayyazi A, Scheel O, Werfel T, Schweyer S, Oppermann M, Götze O, Zwirner J (2000) The C5a receptor is expressed in renal proximal tubular but not in pulmonary or hepatic epithelial cells. *Immunology* 99: 38-45

Fayyazi-A; Sandau-R; Duong-LQ; Gotze-O; Radzun-HJ; Schweyer-S; Soruri-A; Zwirner-J (1999) C5a receptor and interleukin-6 are expressed in tissue macrophages and stimulated keratinocytes but not in pulmonary and intestinal epithelial cells. *Am J Pathol* 154: 495-501

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

Fernandez HN, Hugli TE (1978) Primary structural analysis of the polypeptide portion of human C5a anaphylatoxin. Polypeptide sequence determination and assignment of the oligosaccharide attachment site in C5a. *J Biol Chem* 253: 6455-6464

Fukuoka Y, Ember JA, Hugli TE (1998) Cloning und characterization of rat C3a receptor: Differential expression of rat C3a and C5a receptors by LPS stimulation. *Biochem Biophys Res Comm* 242: 663-668

Gasque P, Chan P, Fontain M, Ischenko A, Lamasz M, Götze O, Morgan BP. (1995) Identification and characterization of the complement C5a anaphylatoxin receptors in human astrocytes. *J Immunol* 155: 48882-48889

Gasque P, Shingrao SK, Neal JW, Götze O, Morgan BP (1997) Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. *Am. J. Pathol* 150: 31-41

Geiger T, Andus T, Klapproth J, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC (1988) Induction of rat acute-phase proteins by interleukin-6 *in vivo*. *Eur J Immunol* 18: 717-721

Gerard C (1998) For whom the bell tolls. *Nature* 395: 217-219

Gerard NP, Gerard C (1991) The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* 349: 614-617

Gerard NP, Hodges MK, Drazen JM, Weller PF, Gerard C (1989) Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin in human eosinophils. *J Boil Chem* 264: 1760-1766

Greenberg SS, Ouyang J, Zsao X, Xie J, Wang JF, Giles TD (1997) Interaction of ethanol with inducible nitric oxide synthase messenger RNA and protein: direct effects on autacoids and endotoxin *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 1044-1054

Grewe M, Duyster J, Dieter P, Henning H, Schulze-Specking A, Decker K (1992) Prostaglandin D₂ und E₂ synthesis in rat Kupffer cells are antagonistically regulated by lipopolysaccharide and phorbol ester. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 373: 655-664

Grumwald U, Krüger C, and Schütt C (1993) Endotoxin-neutralizing capacity of soluble CD 14 is a highly conserved specific function. *Circ Shock* 39: 220-225

Hafenrichter DG, Roland CR, Mangino MJ, Flye MW (1994) The Kupffer cell in endotoxin tolerance: mechanisms of protection against lethal endotoxemia. *Shock* 2 (4): 251-6

Hampton RY, Golenbock DT, Penman M, Krieger M, Raetz CR (1991) Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* 353: 342-344

Haviland DL, McCoy RL, Akama H, Molmenti EP, Brown A, Haviland JC, Parks WC, Perlmutter DH and Wetsel RA (1995) Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): Demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *J Immunol* 154: 1861-1869

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 and Andus T. (1990) Interleukin -6 and the acute-phase-response. *Biochem J* 265: 621-636

Helfgott DC, May LT, Stoeber Z, Tamm I, Sehgal PB (1987) Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of β 2-interferon by human fibroblasts. *J Exp Med* 166, 1300-1309

Hespeling U, Püschel GP, Jungermann K, Götze O, Zwirner J. (1995) Stimulation of glycogen phosphorylase in rat hepatocytes via prostanoid release from Kupffer cells by recombinant rat anaphylatoxin C5a but not by native human C5a in hepatocyte/Kupffer cell co-cultures. *FEBS Lett* 372, 108-112

Hibi M, Nakajima, Hirano T (1996) IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med* 74: 1-12

Hoque AM, Papapetropoulos A, Venema RC, Catravas JD, Fuchs LC (1998) Effects of anti-sense oligonucleotide to iNOS on hemodynamic and vascular changes induced by LPS. *Am J Physiol* 275: 1078-1083

Hsu MH, Wang M, Browning DD, Mukaida N, Ye RD (1999) NF- κ B activation is required for C5a-induced interleukin-8 gene expression in mononuclear cells. *Blood*: 3241-3249

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: 591-598

Ito A, Takii T, Matsumura T, Onozaki K (1999) Augmentation of Type I IL-1 receptor expression and IL-1 signalling by IL-6 and glucocorticoid in murine hepatocytes. *J Immunol* 162: 4260-4265

Ikejima K, Enomoto N, Imuro Y, Ikejima A, Fang D, Xu J, Forman DT, Brenner DA, Thurman RG (1998) Estrogen increases sensitivity of hepatic Kupffer cells to endotoxin. *Am J Physiol* 274: 669-676

Jepson MM, Pell JM, Bates PC, Millward DJ (1986) The effects of endotoxaemia on protein metabolism in skeletal muscle and liver of fed and fasted rats. *Biochem J* 235: 329-336

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(1): 100-106

Jungermann K and Kietzmann T (1996) Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu. Rev Nutr* 16: 179-203

Kirschning CJ, Wesche H, Merrill-Ayres T, Rothe M (1998) Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 188: 2091-2097

Koj A (1996) Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochem Biophys acta* 1317: 84-94

Kurimoto Y, de Weck AL, Dahinden CA (1989) Interleukin-3-dependent mediator release in basophils triggered by C5a. *J Exp Med* 170: 467-479

Lacy M, Jones J, Whittemore SR, Haviland DL, Wetsel RA, Barnum SR (1995) Expression of the receptors of the C5a anaphylatoxin, interleukin-8 and FMLP human astrocytes and microglia. *J. Neuroimmunol* 61: 71-78

Laskin DL, Heck DE, Gardner CR, Feder LS, Laskin JD (1994) Distinct patterns of nitric oxide production in hepatic macrophages and endothelial cells following acute exposure of rats to endotoxin. *J Leukoc Biol* 56: 751-758

Leeuwenberg JFM, Van Asmuth EJ, Jeurissen TMA and Buurman WA (1990) IFN- γ regulates the expression of the adhesion molecule ELAM-1 and IL-6 production by human endothelial cells in vitro. *J Immunol* 145: 2110-2114

Liu S, Khemlani LS, Shapiro RA, Johnson ML, Liu K, Geller DA, Watkins SC, Goyert SM, Billiar TR (1998) Expression of CD14 by hepatocytes: Upregulation by Cytokines during Endotoxemia. *Infect Immun* 66: 5089-5098

Löffler G and Petrides P (1990) *Physiologische Chemie* (4. Auflage, 1. korrigierter Nachdruck), Springer Verlag

Lukacs NW, Streiter RM, Einer VM, Evanoff HL, Burdick MD, Kunkel SL (1994) ICAM-1 mediates the expression of monocytes derived MIP1 alpha during monocyte endothelial cell interaction. *Blood* 83: 1174-1178

Lukacs NW, Streiter RM, Einer VM, Evanoff HL, Burdick MD, Kunkel SL (1995) Production of chemokines, IL8 and MCP-1 during monocyte endothelial cell interactions. *Blood* 86: 2767-2774

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

McCoy R, Haviland DL, Molmenti EP, Ziambaras T, Wetsel TA, Perlmutter DH (1995) N-formylpeptide and complement C5a receptor are expressed in liver cells and mediate hepatic acute-phase-gene regulation. *J Exp Med* 182: 207-217

Mäck C, Schieferdecker HL, Nolte A and Jungermann K (1999) Synergistic stimulation by anaphylatoxin C5a and endotoxin of the release of the proinflammatory cytokine IL-6 from Kupffer cells: Role in α 2-macroglobulin synthesis during the acute phase response in hepa-

toocytes. In „Cells of the hepatic sinusoid,, Vol. 7 E.Wisse, DL Knook, R de Zanger and R Fraser: 64-67

Marinkovic S, Jahreis GP, Wong GG, Baumann H (1989) IL-6 modulates the synthesis of a specific set of acute phase plasma proteins *in vivo*. J Immunol 142: 808-812

Marmioli S, Bavelloni A, Faenza I, Sirri A, Ognibene A, Cenni V, Tsukada J, Koyama Y, Ruzzene M, Ferri A, Auron Ph, Toker A, Maraldi N (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase is recruited to a specific site in the activated IL-1 receptor I. FEBS Lett 438: 49-54

Mascagni P, Sabbatini V, Biordi L, Martinotti S, Allegretti M, Marullo A, Caselli G, Bertini R (2000) R- and S-isomers of nonsteroidal anti-inflammatory drugs differentially regulate cytokine production. Eur Cytokine Netw 11: 185-192

May LT, Ghrayeb J, Santhanam U, Tatter SB, Stoeber Z, Helfgott DC, Chiorazzi N, Grieninger G, Sehgal PB (1988a) Synthesis and secretion of multiple forms of $\beta 2$ interferon/ B cell differentiation factor 2/ hepatocyte stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. J Biol Chem 263: 7760-7766

May LT, Santhanam U, Tatter SB, Helfgott DC, Ray A, Ghrayeb J, Sehgal PB (1988b) Phosphorylation of secreted forms of human $\beta 2$ -interferon/ hepatocyte-stimulating factor/ interleukine-6. Biochem Biophys Res Commun 152: 1144-1150

Meredith MJ (1988) Rat hepatocytes prepared without collagenase: prolonged retention of differentiated characteristics in culture. Cell Biol Toxicol 4: 405-425

Nataf S, Davoust N, Barnum SR (1998) Kinetics of anaphylatoxin C5a receptor expression during experimental allergic encephalomyelitis. J. Neuroimmunol 91: 147-155

Neta R, Vogel SN, Sipe JD, Wong GG, Nordan RP (1988) Comparison of *in vivo* effects of human recombinant IL-1 and human recombinant IL-6 in mice. Lymphokine Res 7: 403-412

Oldenburg HSA, Pruitt JH, Lazarus DD, Rogy MA, Chizzonite R, Lowry SF, Moldawer LL (1995) Interleukin-1 binding to its type I, but not type II receptor, modulates the in vivo acute phase response. *Cytokine* 7: 510-516

Omar HM, Rosenblum JK, Sanders RA, Watkins JB 3-rd (1998) Streptozotocin may provide protection against subsequent oxidative stress of endotoxin or streptozotocin in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 12: 143-9

Osaka H, McGinty A, Hoepken UE, Lu B, Gerard C, Pastinetti GM. (1999) Expression of C5a receptor in mouse brain: role in signal transduction and neurodegeneration. *Neuroscience*; 88: 1073-1082

Panesar N, Tolman K, Mazuski JE (1999) Endotoxin stimulates hepatocyte interleukin-6 production. *J Surg Res* 85: 251-258

Paradisis PM, Campbell IL, Barnum SR (1998) Elevated complement C5a receptor expression on neurons and glia in astrocyte-targeted interleukin-3 transgenic mice. *Glia* 24:338-345

Paul WE (1989) *Fundamental Immunology* (second edition) Raven Press, New York

Perregaux D., Gabel CA (1994) Interleukin 1 β maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem* 269: 637-645

Peters M, Jacobs S, Ehlers M, Vollmer P, Müllberg J, Wolf E, Brem G, zum Büschenfelde K-H M, Rose-John S (1996) The function of the soluble interleukin-6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half life of IL-6. *J Exp Med* 183: 1399-1406

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: 187-91

Praaning-van Dalen DP, Brouwer A, Knook (1981) Clearance capacity of rat liver Kupffer, endothelial, and parenchymal cells. *Gastroenterology* 81: 1036-1044.

Preister JC, Schmartz D, van der Linden P, Content J, Vanden-Bussche P, Buurman W, Sabald W, Dupond E, Pinsky MR, Vincent JL (1991) Interleukin-6 administration has no acute hemodynamic and hematologic effects in the dog. *Cytokine* 3: 1-4

Püschel GP, Nolte A, Schieferdecker HL, Rothermel E, Götze O, Jungermann K (1996) Inhibition of anaphylatoxin C3a- and C5a-but not nerve stimulation- or noradrenalin-dependent increase in glucose output and reduction of flow in Kupffer cell-depleted perfused rat livers. *Hepatology* 24: 685-690

Püschel GP, Oppermann M, Muschol W, Götze O, Jungermann K (1989) Increase of glucose and lactat output and decrease of flow by human anaphylatoxin C3a but not C5a in perfused rat liver. *FEBS Lett* 243: 83-87

Püschel GP, Schieferdecker, Fennekohl A, Timmermann A and Jungermann K (1997) : Differential expression of prostanoid receptors in Kupffer cells, sinusoidal endothelial cells and hepatocytes. In „Cells of the hepatic sinusoid,, Vol.6 E.Wisse, DL Knook and C. Balabaud :134 137

Ramadori G and Christ B (1999) : Cytokines and the hepatic acute phase response. *Semin Liver Dis* 19: 141-155

Ramadori G, Rasokat H, Burger R, Meyer zum Buschenfelde KH, Bitter-Suermann D (1984) Quantitative determination of complement components produced by purified hepatocytes. *Clin Exp Immunol* 55: 189-196

Rizzardini M, Zappone M, Villa P, Gnocci P, Sironi M, Diomedede L, Meazza C, Monshouwer M, Cantoni L (1998) Kupffer cell depletion partially prevents hepatic heme oxygenase 1 messenger RNA accumulation in systemic inflammation in mice: role of interleukin 1 beta. *Hepatology* 1998 27: 703-710

Roitt I, Brostoff J, Male D (1996) *Immunology*, 4-th edition. Mosby, imprint of Times Mirror International Publishers Ltd; London, England

Rothermel E, Götze O, Zahn S, Schlaf G (2000) Analysis of the tissue distribution of the rat C5a receptor and inhibition of C5a-mediated effects throughg the use of two monoclonal antibodies. *Scand. J. Immunol.* 52: 401-10

Rothermel E, Rolf O, Götze O, Zwirner J (1997) Nucleotide and corrected amino acid sequence of the functional recombinant rat anaphylatoxin C5a. *Biochem. Biophys. Acta* 1351: 9-12

Rothermel E, Zwirner J, Vogt T, Rabini S, Götze O (1997) Molecular cloning and expression of the functional rat C5a receptor. *Mol Immunol* 34: 877-886

Ruiter DJ, van der Meulen J, Brouwer A, Hummel MJ, Mauw BJ, van der Ploeg JC, Wisse E. (1981) Uptake by liver cells of endotoxin following its intravenous injection. *Lab Invest.* 45(1):38-45.

Saad B, Frei K, Scholl FA, Fontana A, Maier P (1995) Hepatocyte-derived interleukin-6 and tumor-necrosis factor alpha mediate the lipopolysaccharide-induced acute-phase response and nitric oxide release by cultured rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 229: 349-55

Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Ehrlich HA (1989) Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 86: 6230-6234

Sasse D (1992) Liver architecture, *Enzyme* 46, 8-32

Schieferdecker HL, Pestel S, Püschel GP, Götze O, Jungermann K (1999) Increase by anaphylatoxin C5a of glucose output in perfused rat liver via prostanoids derived from nonparenchymal cells: direct action of prostaglandins and indirect action of thromboxane A (2) on hepatocytes. *Hepatology* 30 (2): 454-461

Schieferdecker HL, Pestel S, Rothermel e, Püschel GP, Götze O, Jungermann K (1998) Stimulation by anaphylatoxin C5a of glycogen phosphorylase in rat hepatocytes via prostanoid release from hepatic stellate cells but not sinusoidal endothelial cells. *FEBS Lett* 1998; 434: 245-250

Schieferdecker HL, Püschel GP, Rothermel E, Timermann A and Jungermann K (1997a) : The thromboxane receptor antagonist daltroban inhibits glucose output and increases prostanoid overflow induced by anaphylatoxins in perfused rat liver but not in isolated Kupffer cells. In „Cells of the hepatic sinusoid,, Vol.6 (E.Wisse, DL Knook and C. Balabaud eds.): 357-362

Schieferdecker HL, Rothermel E, Timmermann A, Götze O, Jungermann K (1997b) Anaphylatoxin C5aR mRNA is strongly expressed in Kupffer and stellate cells and weakly in sinusoidal endothelial cells but not in hepatocytes of normal rat liver. FEBS Lett 406: 305-308

Schlaf G, Schieferdecker HL, Rothermel E, Jungermann and Götze O (1999) Differential expression of the C5a receptor on the main cell types of rat liver as demonstrated with a novel monoclonal antibody and by C5a anaphylatoxin-induced Ca^{2+} release. Lab Invest 79:1287-1297

Scoazec JY, Feldmann G (1994) The cell adhesion molecules of hepatic sinusoidal endothelial cells. J Hepatol 20: 296-300

Shirato M, Takahashi K, Nagasawa S, Koyama J (1988) Different sensitivities of the responses of human neutrophils stimulated with immune complex and C5a anaphylatoxin to pertussis toxin. FEBS Lett 234: 231-234

Short A, Wong AK, Finch AM, Haaima G, Shiels IA, Fairlie DP, Taylor SM (1999) Effects of a new C5a receptor antagonist on C5a- and endotoxin-induced neutropenia in the rat. Br J Pharmacol 126:551-554

Shum JK, Allen RA, Wong YH (1995) The human chemoattractant complement C5a receptor inhibits cyclic AMP accumulation through G_i and G_z proteins. Biochem Biophys Res Commun 8: 2223-2229

Siciliano SJ, Rollins TE, Springer MS (1990) Interaction between the C5a receptor and G_i in both the membrane-bound and detergent-solubilized states. J Biol Chem 265: 19568-19574

Simpson KJ, Lukacs NW, Colletti L, Strieter M and Kunkel SL (1997) Cytokines and the liver. J Hepatology 27:1120-1132

Singhrao SK, Neal JW, Morgan BP, Gasque P (1999) Increased complement biosynthesis by microglia and complement activation on neurons in Huntington's disease. Exp Neurol 159: 362-376

Stahel PF, Frei K, Eugster HP, Fontana A, Hummel KM, Wetsel RA, Ames RS, Barnum SR (1997a) TNF-alpha-mediated expression of the receptor for anaphylatoxin C5a on neurons in experimental *Listeria meningoenzephalitis*. *J Immunol* 159: 861-869

Stahel PF, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC, Hans VH, Barnum SR (1997b) Experimental diffuse axonal injury induces enhanced neuronal C5a receptor mRNA expression in rats. *Mol Brain Res* 50: 205-212

Stites D, Terr AI, Parslow TG (1994) *Basic & clinical Immunology*, 8-th edition, by Appleton & Lange, Paramount Publishing Business and professional group, East Norwalk, Connecticut

Straub RH; Gluck T, Cutolo M, Georgi J, Helmke K, Scholmerich J, Vaith P, Lang B (2000) The adrenal steroid status in relation to inflammatory cytokines (interleukin-6 and tumour necrosis factor) in polymyalgia rheumatica. *Rheumatology Oxford* 39: 624-631

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

Taga T and Kishimoto T (1997) Gp130 and the IL-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15: 797-819

Thornton AJ, Ham J, Kunkel SL (1992) Kupffer cell derived cytokines induced the synthesis of a leukocytes chemotactic peptide, interleukin 8, in human hepatoma and primary hepatocyte cultures. *Hepatology* 15: 1112-1122

Thornton AJ, Streiter RM, Lindley I, Baggiolini M, Kunkel SL (1990) Cytokine induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/ IL8 in human hepatocytes. *J. Immunol* 144: 2609-2613

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

Tschaikowsky K, Sagner S, Lehner N, Kaul M, Ritter J (2000) Endothelin in septic patients: effects on cardiovascular and renal function and its relationship to proinflammatory cytokines. *Crit Care Med* 28: 1854-1860

Ulevitch RJ, Tobias PS (1995) Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 13: 437-457

van Oosten M, van de Bilt E, de Vries HE, van Berkel TJ, Kuiper J (1995) Vascular adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression on rat liver cells after lipopolysaccharide administration in vivo. *Hepatology* 22: 1538-1546

Werfel T, Oppermann M, Schulze M, Krieger G, Weber M, Götze O (1992) : Binding of fluorescein-labeled anaphylatoxin C5a to human peripheral blood, spleen, and bone marrow leukocytes. *Blood* 79: 151-159

Williamson MP and Madison VS (1990) Three dimensional structure of porcine C5adesArg from ¹H nuclear magnetic resonance data. *Biochemistry* 29: 2895-2905

Wilmer WA, Kaumaya PT, Ember JA, Cosio FG (1998) Receptors for the anaphylatoxin C5a (CD88) on human mesangial cells. *J Immunol* 160: 5646-5652

Wisse E (1970) An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J Ultrastruct Res* 31:125-150

Wright SD, Levin SM, Jong MT, Chad Z, Kabbash LG (1989) CR3 (CD11b/CD18) expresses one binding site for arg-gly-asp-containing peptides and a second site for bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 169: 175-183

Yano H, Kinoshita S, Yano L (1999) Role of kupffer cells in acute exercise-induced intestinal mucosal lesions in rats. In: Wisse E, Knoock DL, Frazer R eds. *Cells of the hepatic sinusoid*. Vol 7. Leiden, Holland: Kupffer Cell Foundation, 247-8

Yassad A, Husson A, Bion A, Lavoine A (2000) Synthesis of interleukin 1beta and interleukin 6 by stimulated rat peritoneal macrophages: modulation by glutamine. *Cytokine*; 12: 1288-1291

Zhang F, zur Hausen A, Hofmann R, Grewe M, Decker K (1994) Rat liver macrophages express the 55 kDa tumor necrosis factor receptor: modulation by interferon-gamma, lipopolysaccharide and tumor-necrosis factor-alpha. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375:249-254

Zuiderweg ERP, Nettesheim DG, Mollison KW and Carter GW (1989) Tertiary structure of human complement component C5a in solution from nuclear magnetic resonance data. *Biochemistry* 28. 172-185

Zwirner J; Fayyazi A; Gotze O (1999) Expression of the anaphylatoxin C5a receptor in non-myeloid cells. *Mol Immunol* 36: 877-884

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Kurt Jungermann für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die wertvollen Ratschläge und Anregungen.

Frau Dr. Henrike Schieferdecker danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, für die zahlreichen Diskussionen und besonders für ihre Hilfe und Geduld in der letzten Phase des Zusammenschreibens.

Herrn Prof. Dr. Otto Götze danke ich für die Möglichkeit, den immunochemischen Teil meiner Arbeit in der Abteilung Immunologie durchzuführen. Besonders danke ich Herrn Dr. Gerald Schlaf für seine Hilfe und endlose Begeisterungsfähigkeit.

Meinen Kolleginnen aus unserem „Frauenlabor“ Claudia Mäck, Sabine Pestel, Annegret Nath und Christiane Spillner danke ich für ihre Hilfe und Unterstützung in dem oft frustrierenden Laboralltag.

Allen Kollegen in der Abteilung danke ich für die gute Zusammenarbeit; Bettina Scholtka, Birgit Döring, Frank Stümpel, Frank Rhode, Jae Sun Kim und Angela Hunger danke ich besonders - für mich hatten sie immer nicht nur einen Perfusionsplatz frei, sondern auch ein gutes Wort und den besten Nachmittagstee.

Meiner Familie und meinen bulgarischen Freunden in Göttingen danke ich für ihre Liebe und ständigen Unterstützung, für all die guten Tage, ohne die das Leben „anders“ ausgesehen hätte.

Lebenslauf

Name: Milena Koleva

Geburtsdatum: 7.08.1970

Geburtsort: Dobrich, Bulgarien

Staatsangehörigkeit: bulgarisch

Familienstand: ledig

1977-1984 Grundschule, Dobrich, Bulgarien

1984-1989 Sprachgymnasium, Dobrich, Bulgarien
(Deutsch)

1989-1990 Studium an der Chemischen Fakultät,
Sofioter Universität, Sofia, Bulgarien
(Chemie und Physik)

1990-1996 Studium an der Biologischen Fakultät,
Sofioter Universität, Sofia, Bulgarien
(Biochemie)

1996-1997 Diplomarbeit an der Medizinischen Akademie,
Sofia, Bulgarien

Juli 1997 MSc in Biochemie

November 1997 Stipendiatin des GRK 335 "Klinische, Zelluläre
und Molekulare Biologie Innerer Organe"
(Sprecher: Prof. Dr. G. Burckhardt)

November 1997 Beginn der experimentellen Arbeit zur
vorliegenden Dissertation am Institut für
Biochemie und molekulare Zellbiologie
(Leiter: Prof. Dr. K. Jungermann)

seit April 1998 Assistentin des Biochemischen Praktikums für
Mediziner und Zahnmediziner

März 2001 Abgabe der vorliegenden Dissertation