

Repopulation genetisch veränderter Kupffer-Zellen und Evaluation deren Effekte in einem akuten hepatischen Schädigungsmodell



**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der
naturwissenschaftlichen Fakultät IV-
Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Peter Walbrun
aus Schwandorf
2006**

Für meine Eltern

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2004 bis November 2006 an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Klinikums der Universität Regensburg unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Sigurd Elz, PD. Dr. med. Claus Hellerbrand und Dr. med. Matthias Froh.

Promotionsgesuch eingereicht am:

22.12.2006

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:

Prof. Dr. rer. nat. G. Franz

1. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. S. Elz

2. Gutachter:

PD. Dr. med. C. Hellerbrand

3. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. J. Heilmann

Tag der mündlichen Prüfung:

22.02.2007

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis	4
2 Einleitung	9
2.1 Makrophagen	9
2.1.1 Entwicklung von Makrophagen	9
2.1.2 Funktionen von Makrophagen	11
2.2 Medizinischer Hintergrund	12
2.2.1 Anatomie, Morphologie und Physiologie der Leber	12
2.2.2 Das Blutgefäßsystem der Leber	14
2.2.3 Feinanatomie der Leber	14
2.2.4 Zelluläre Bestandteile der Leber	16
2.2.5 Funktionen und Aufgaben der Leber	17
2.2.6 Ätiologie und Pathologie von Lebererkrankungen	19
2.2.7 Lebertransplantationen	20
2.2.8 Ischämie- und Reperfusionsschaden bei Lebertransplantationen	23
2.3 Die Rolle von Interleukin 10 als anti-inflammatorisches Zytokin	26
3 Zielsetzung	30
4 Materialien und Methoden	31
4.1 Materialien und Geräte	31
4.1.1 Materialien und Geräte für die Zellisolation	31
4.1.2 Materialien und Geräte für die Zellkultur	32
4.1.3 Materialien und Geräte für die Durchfluszytometrie	32
4.1.4 Sonstige Materialien	33
4.1.5 Sonstige Geräte	35
4.1.6 Fertigkombinationen von Biochemikalien	36
4.1.7 Oligonukleotide	36
4.1.8 Antikörper	37
4.1.9 Lösungen, Puffer und Medien	38
4.2 Methoden	42
4.2.1 Tierhaltung und humanes Lebermaterial	42
4.2.2 Isolation von Kupffer-Zellen aus Ratten-Lebern bzw. aus humanem Lebergewebe	42

4.2.3 Magnetische Zellsortierung von Ratten-Kupffer-Zellen (MACS)	48
4.2.4 Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence activated cell sorting)	49
4.2.5 Einfrieren und Auftauen von Kupffer-Zellen	51
4.2.6 Phagozytoseaktivitätsassay	52
4.2.6.1 Präparation und Phagozytose von fluoreszierenden Latex-Beads	52
4.2.6.2 Quantitative Auswertung der Phagozytose von FITC- markierten Latex-Beads durch FACS-Analysen	52
4.2.7 Virale Methoden	53
4.2.7.1 Kultur von HEK 293 Zellen	53
4.2.7.2 Vermehrung von Adenoviren	54
4.2.7.3 Dichtegradientenzentrifugation zur Anreicherung der Adenoviren	54
4.2.7.4 Virustiterbestimmung	55
4.2.8 Tierversuche	56
4.2.8.1 Repopulation von Karbon-markierten Kupffer-Zellen	56
4.2.8.2 Repopulationen von adenoviral transduzierten Kupffer- Zellen	57
4.2.8.3 Repopulation von adenoviral transduzierten Kupffer-Zellen in einem akuten Schädigungsmodell der Leber (Ischämie- /Reperfusionsmodell)	58
4.2.9 Isolation von RNA	59
4.2.10 Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung von RNA	60
4.2.11 Reverse Transkription	61
4.2.12 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	62
4.2.13 Nicht denaturierende Agarosegelektrophorese	63
4.2.14 DNA-Microarray Analyse	63
4.2.15 Proteinisolierung	65
4.2.16 Quantitative Messung von Proteinen	65
4.2.16.1 Proteingehaltsbestimmung	65
4.2.16.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	66
4.2.17 Western Blot	66
4.2.18 Histologie	67

4.2.19 Bestimmung von Serumwerten	69
4.2.20 Statistische Auswertung	69
5 Ergebnisse	71
5.1 Isolation von Kupffer-Zellen	71
5.2 Transplantation von Ratten-Kupffer-Zellen (allgemein)	75
5.2.1 Repopulation von Karbon-markierten Kupffer-Zellen in Ratten-Lebern	75
5.2.2 Integration transplantiert Kupffer-Zellen außerhalb des Zielgewebes	78
5.2.3 Generelle Auswirkung der Transplantation von Kupffer-Zellen auf den Empfänger	80
5.3 Veränderung des Genexpressionsmusters in humanen Kupffer-Zellen bei Fibrose/Zirrhose	83
5.3.1 Globales mRNA-Expressionsprofil eines Zirrhose-Patienten im Vergleich zu einem Kontrollpatienten	83
5.3.2 Pathway-bezogene Auswertung der DNA-Microarray Ergebnisse	85
5.4 Transplantation von Ratten-Kupffer-Zellen (speziell)	90
5.4.1 <i>In vitro</i> Transduktion von Kupffer-Zellen	90
5.4.2 Transplantation von adenoviral transduzierten Ratten-Kupffer-Zellen	97
5.5 Effekte der adenoviralen Überexpression von humanem Interleukin 10 in einem Ischämie-/Reperfusions-Schädigungsmodell der Leber	102
5.6 Kryokonservierung von Kupffer-Zellen	105
5.6.1 Überlebensrate von kryokonservierten Kupffer-Zellen	105
5.6.2 Kultivierungsprofile von frischen und kryokonservierten Kupffer-Zellen	106
5.6.3 Zytokinsekretion von frischen und kryokonservierten Kupffer-Zellen nach LPS-Stimulation	108
5.6.4 Phagozytoseaktivität von frischen und kryokonservierten Kupffer-Zellen	110
6 Diskussion	113
6.1 Die verwendete Isolationsmethode führt zu einer funktionell intakten Kupffer-Zell-Population	113

6.2 Transplantation von Kupffer-Zellen	115
6.2.1 Die Vorbehandlung der Empfängertiere mit Cyclosporin A bewirkt eine signifikante Verbesserung der Repopulationsrate von Kupffer-Zellen	116
6.2.2 Die Transplantation von Kupffer-Zellen führt zu einer exklusiven Integration der Zellen innerhalb des Zielgewebes	118
6.2.3 Die Transplantation von Kupffer-Zellen hat keine (signifikanten) inflammatorischen Auswirkungen auf das Lebergewebe des Empfängers	119
6.3 Hochregulation von Genen in der Kupffer-Zell-Population des Zirrhosepatienten, die bei der Inflammation, bei oxidativem Stress sowie der Aktivierung von Kupffer-Zellen eine Rolle spielen	120
6.4 Adenovirale Transduktion von Kupffer-Zellen	121
6.4.1 Die Kupffer-Zellen werden mit den verwendeten adenoviralen Vektoren effizient transduziert	122
6.4.2 Der Nachweis des Transgens nach Transplantation von adenovirale transduzierten Kupffer-Zellen war auf RNA-Ebene erfolgreich	123
6.5 Die Überexpression von (humanem) Interleukin 10 hat einen protektiven Effekt im akuten Schädigungsmodell der Leber	125
6.6 Kryokonservierung von Kupffer-Zellen	125
6.6.1 Sowohl Ratten- als auch humane Kupffer-Zellen zeigen adäquate Überlebensraten nach der Kryokonservierung	127
6.6.2 Die Kultivierungsprofile von frischen und kryokonservierten Kupffer-Zellen sind miteinander vergleichbar	128
6.6.3 Frische und kryokonservierte Kupffer-Zellen unterscheiden sich nicht in ihrem Stimulationsverhalten	128
6.6.4 Frische und kryokonservierte Kupffer-Zellen zeigen keine Unterschiede in ihren Phagozytoseeigenschaften	129
7 Zusammenfassung	130
8 Abkürzungsverzeichnis	132
9 Literaturverzeichnis	136
10 Anhang	153
10.1 Danksagungen	153
10.2 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	155

2 Einleitung

2.1 Makrophagen

2.1.1 Entwicklung von Makrophagen

Makrophagen entwickeln sich im Knochenmark aus einer pluripotenten Stammzelle über die myeloische Reihe (Abb. 1).

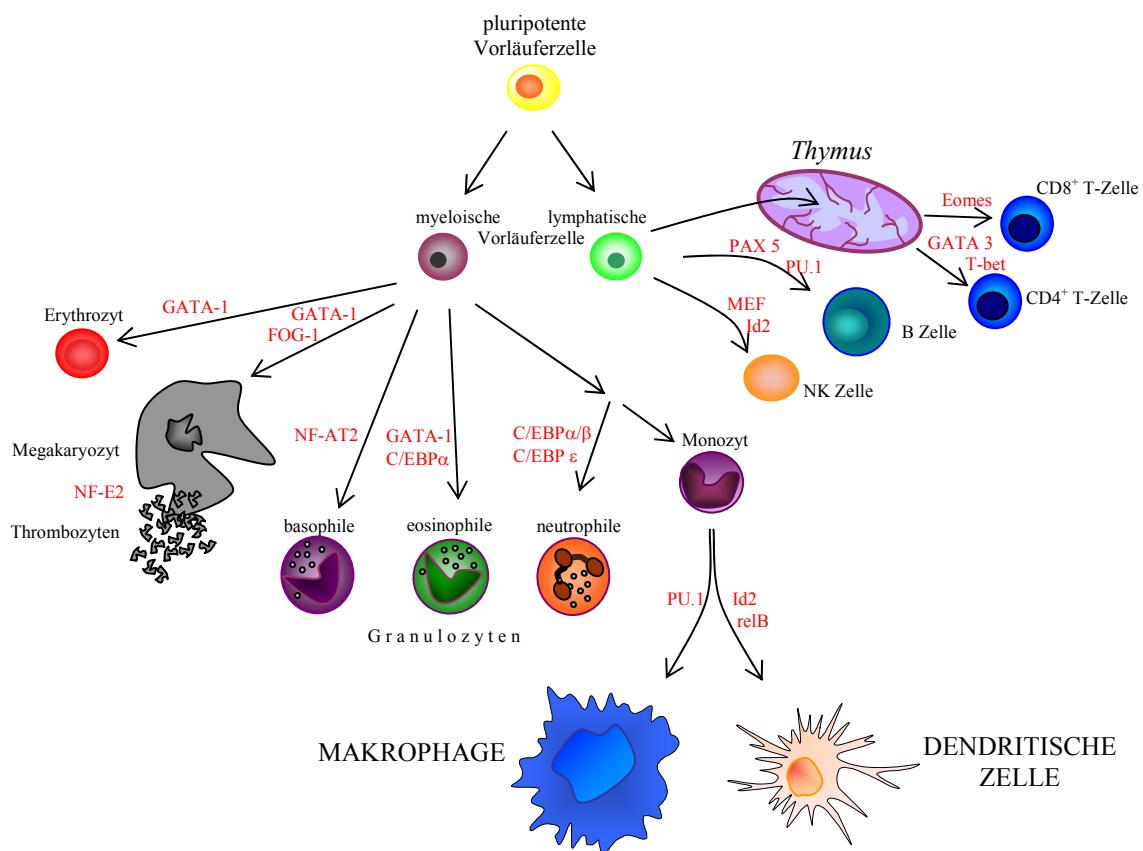


Abb. 1: Stammbaum der Hämatopoiese. Entwicklungsspezifische Transkriptionsfaktoren sind rot markiert (1).

Bei der Differenzierung aus der Vorläuferzelle zum reifen Monozyt spielen eine Reihe von Wachstumsfaktoren eine Rolle. Hierzu zählen GM-CSF (Granulozyten-Monozyten colony stimulating factor), multi-CSF (IL 3) und im späteren Prozess vor allem M-CSF (Monozyten colony stimulating factor). Die Monozyten gelangen etwa einen Tag nach ihrer Reifung aus dem Knochenmark in die Blutbahn, zirkulieren dort mit einer Halbwertszeit von 8 bis 70 Stunden und wandern schließlich durch den

Vorgang der Migration in verschiedene Gewebe ein (Diapedese). Im Gewebe differenzieren die Monozyten, abhängig vom jeweiligen Mikromilieu, zu unterschiedlichen, sessilen Makrophagentypen aus (Tab. 1). Die Bedingungen des Mikromilieus, die zu der Vielfalt an Makrophagentypen bzw. zu einer gewebespezifischen Differenzierung führen, sind weitgehend unbekannt (2). Ausdifferenzierte, sessile Makrophagen können über mehrere Jahre im Gewebe verbleiben, wobei sie jedoch meist nicht mehr replikationsfähig sind. Die Makrophagenpopulation der Leber, die Kupffer-Zellen (KCs), bildet hier eine Ausnahme, da sie die Fähigkeit zur Proliferation nach der Ausdifferenzierung beibehalten.

Gewebe	Zelltyp
Bindegewebe	Histiozyten
Entzündliches Gewebe	Reaktive Makrophagen/Multinukleäre Riesenzellen
Gastrointestinaltrakt	Mukosamakrophagen
Granulom	Mehrkernige Makrophagen
Haut	Histiozyten/Langerhanszelle
Knochen	Osteoklasten
Körperhöhlen	Exudatmakrophagen (Pleura-, Peritoneal-makrophagen)
Leber	Kupffer-Zellen
Lunge	Alveolarmakrophagen
Milz	Milzmakrophagen
Plazenta	Hofbauer-Zellen
Synovium	Typ-A-Zellen
Tumorgewebe	Tumor-assoziierte Makrophagen
Zentrales Nervensystem	Mikroglia

Tab. 1: Makrophagen in unterschiedlichen Geweben.

2.1.2 Funktionen von Makrophagen

Als Bestandteil des mononuklear-phagozytären Systems haben die Makrophagen vielfältige Funktionen im Rahmen der Erregerabwehr. Sie sind entscheidend an Prozessen der angeborenen und der Induktion der spezifischen, adaptiven Immunantwort beteiligt.

Spezifische Aufgaben von Makrophagen:

- Phagozytose
- Antigenpräsentation
- Zytokinsekretion (u.a. IL 1, IL 6, IL 8, IL 12, IL 18, TNF α , IFN, GM-CSF, M-CSF, MCP 1, PAF)
- Bildung von Komponenten des Komplementsystems
- Bildung von Lipidmediatoren
- Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmetaboliten
- Bildung von degradierenden Enzymen: Cathepsinen, Lysozymen, Kollagenasen, Elastasen, Lipasen, Glycosidasen, Sulphatasen
- Zytotoxizität

Die Phagozytose ist ein bedeutender Prozess *in vivo*, beispielsweise für den Gewebeumbau, die Beseitigung von apoptotischen Zellen oder bei der spezifischen, adaptiven Immunantwort gegen Mikroorganismen. Die Phagozytose wird hierbei hauptsächlich über 3 verschiedene Rezeptorsysteme reguliert (Komplement-, Fc-, Scavenger-Rezeptor). Bei diesem Vorgang schließen Makrophagen körperfremdes Material mit Hilfe von Pseudopodien in die Zelle ein. Die Phagosomen verschmelzen mit Lysosomen zu Phagolysosomen, in denen das körperfremde Material enzymatisch, durch Cathepsine, reaktive Sauerstoffmetabolite und Stickoxide in kleinere Fragmente zerlegt wird. Die Phagozytose wird hierbei generell durch sogenannte Opsonine, wie Immunglobuline und den Komplementfaktor C3b, erleichtert. Die Opsonine markieren die Oberfläche von fremden Materialien, wodurch diese von den Immunglobulin- und C3b-Rezeptoren der Monozyten und Makrophagen besser erkannt werden (2).

Eine weitere wichtige Funktion der Makrophagen ist die Antigenpräsentation. Dabei erfolgt die intrazelluläre Zerkleinerung des in den Phagolysosomen befindlichen kör-

perfremden Materials. Anschließend werden die Fragmente in endosomalen Kompartimenten auf den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (*major histocompatibility complex*, MHC II) geladen und an der Oberfläche der Makrophagen als Antigene den T-Helferzellen präsentiert. Die präsentierten Fragmente werden dann von T-Zell-Rezeptoren erkannt, was zur Auslösung der spezifischen Immunantwort führt (2).

Durch die Zytokinsekretion und die Freisetzung zahlreicher anderer physiologisch aktiver Substanzen können die Makrophagen entscheidend in die Immunantwort eingreifen, wobei sie andere Komponenten des Immunsystems rekrutieren bzw. in ihrer Funktion modulieren. Aktivierte Makrophagen sezernieren Zytokine wie z.B. den Tumornekrosefaktor α (TNF α), das Chemokin MCP-1, die Interleukine IL 1 α , IL 1 β , IL 6, IL 18, Enzyme (z.B. Lysozym), Komplementfaktoren (C1 bis C5), Wachstumsfaktoren (z.B. GM-CSF), Eicosanoide und Prostaglandine. Sie können zusätzlich hochreaktive Sauerstoffverbindungen (z.B. Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid) bilden und chemotaktisch wirkende Signalproteine absondern, die wiederum weitere Phagozyten rekrutieren (2).

Unter Zytotoxizität versteht man das Potential der Makrophagen, Zielzellen abzutöten. Wenn die Oberfläche der Zielzellen mit spezifischen Immunoglobulinen besetzt ist, können diese von Makrophagen mit deren Immunglobulinrezeptoren (Fc γ -Rezeptoren) erkannt werden. Das abschließende Töten der Zelle wird als Antikörper-abhängige Zytotoxizität (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) bezeichnet (3). Ein weiterer Mechanismus der Zytotoxizität von Makrophagen ist die Sekretion zytotoxischer Substanzen (z.B. TNF α , reaktive Sauerstoffspezies), deren Freisetzung zur Lyse der angegriffenen Zellen führen kann.

2.2 Medizinischer Hintergrund

2.2.1 Anatomie, Morphologie und Physiologie der Leber

Die Leber (griechisch Hepar) ist mit einem Gewicht von durchschnittlich 1,8 kg beim erwachsenen Mann und 1,4 kg bei der erwachsenen Frau (4) nach der Haut das schwerste Organ und die größte exokrine Drüse im menschlichen Körper (5). Das rotbraune Organ befindet sich im rechten Oberbauch unmittelbar unterhalb des Zwerchfells und wird durch die unteren Rippen geschützt. Die konvexe Oberfläche

(Facies diaphragmatica) ist mit dem Zwerchfell verwachsen, wodurch jenes den Großteil des Lebergewichtes trägt. Die Unterfläche (Facies visceralis) liegt den abdominalen Eingeweiden auf. Die embryonale Entstehung des Organs erfolgt, in Analogie zu allen anderen Gastrointestinalorganen der Vertebraten, aus dem Endoderm (6). Der klassische anatomische Aufbau der Leber unterteilt die Leber in 2 Hauptlappen (Lobus dexter und Lobus sinister), wobei der rechte wesentlich größer als der linke ist, sowie 2 weiteren den beiden ersten zwischenliegenden und nur rückseitig sichtbaren Lappen (7).

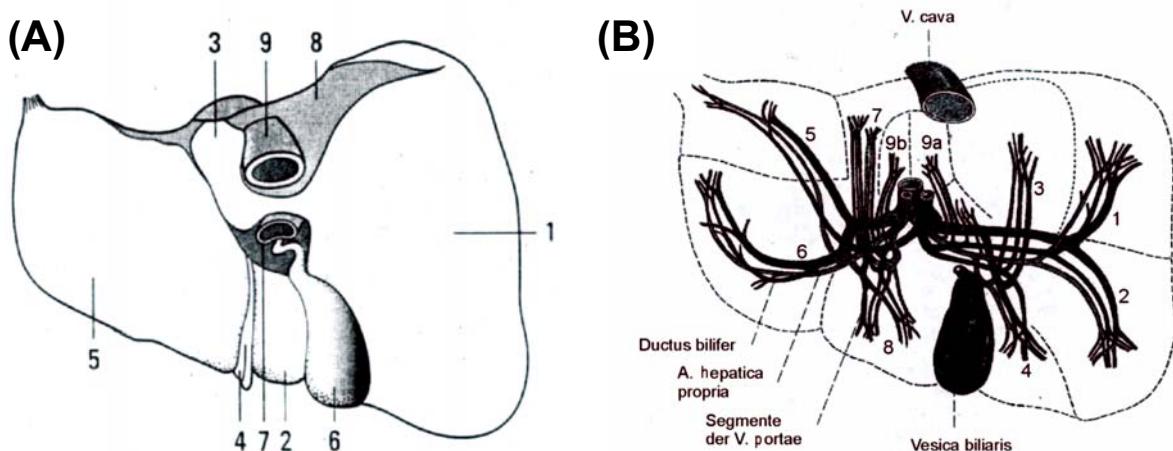


Abb. 2: Makroskopische Anatomie der Leber (Schema). (A) Klassischer Aufbau: 1 = Lobus dexter, 2 = Lobus quadratus, 3 = Lobus caudatus, 4 = Ligamentum teres hepatis, 5 = Lobus sinister, 6 = Vesica biliaris, 7 = Leberhilus mit V. portae, A. hepatica propria und Ductus choledocus, 8 = Area nuda, 9 = Vena cava. (B) Lebersegmente und Subsegmente: 1 = Subsegmentum posterius superius, 2 = Subsegmentum posterius inferius, 3 = Subsegmentum anterius superius, 4 = Subsegmentum anterius inferius, 5 = Subsegmentum laterale inferius, 6 = Subsegmentum laterale superius, 7 = Subsegmentum mediale superius, 8 = Subsegmentum mediale inferius. Der Lobus caudatus wird jeweils von dem rechten Ast der portalen Gefäße (9a) bzw. von ihrem linken Ast (9b) versorgt (7; 8).

Neben dem klassischen anatomischen Aufbau gibt es die moderne, funktionale vaskuläre Anatomie nach dem französischen Chirurgen Couinaud, welcher die Leber in 8 Segmente unterteilt. Diese Segmentierung entspricht nicht der äußeren Lappengliederung und ist charakterisiert durch die voneinander unabhängige afferente und efferente Blutversorgung der Segmente sowie Gallenkanäle ohne kollaterale Zirkulation zwischen den Segmenten (9; 10). Die weitere Gefäßaufteilung führt zur Einteilung in Subsegmente (11).

2.2.2 Das Blutgefäßsystem der Leber

Die Blutversorgung der Leber stellt eine einzigartige Ausnahme im Körper dar. Sie enthält nämlich nicht wie alle anderen Organe nur eine zuführende Arterie mit sauerstoffreichem Blut und eine abführende Vene mit sauerstoffarmem Blut, sondern zusätzlich eine weitere Vene, die das Blut aus den unpaaren Bauchorganen Darm, Magen, Milz und Pankreas in die Leber transportiert. Dieses Gefäß wird als Pfortader (Vena portae) bezeichnet, welche sich innerhalb des Organs in die Venae interlobulares aufspaltet. Sie transportiert ca. 70-80 % des gesamten Blutes, das die Leber durchströmt (1500 ml/min), und führt der Leber alle durch den Gastrointestinaltrakt resorbierten Nähr- und Fremdstoffe zu. Die restlichen 20-30 % dienen der Sauerstoffversorgung des Organs und stammen aus der Leberarterie (Arteria hepatica), deren Verästelungen innerhalb der Leber als Arteriae interlobulares bezeichnet werden. Das efferente Gefäßsystem besteht aus den zentralen Gefäßen (Venae centralis) der Leberläppchen, welche in die Venae sublobulares, von dort in die große Lebervene (Vena hepatica) und schließlich in die untere Hohlvene (Vena cava inferior) münden.

2.2.3 Feinanatomie der Leber

Die Leberlappen sind nochmals in winzige polygonale Zentralvenenläppchen (Leberläppchen, Lobus hepaticus, ca. 2 mm hoch, Ø ca. 1-1,3 mm) unterteilt. Das gesamte Organ besteht aus etwa 1-1,5 Mio dieser Leberläppchen, von denen jedes neben weiteren Zelltypen (siehe 2.2.4) aus je etwa 300000 parenchymalen Zellen (Hepatozyten) aufgebaut ist. Die Hepatozyten haben meist mehrere Zellkerne und sind in Strängen angeordnet („Leberzellbalken“). An den Eckpunkten benachbarter Leberläppchen liegen die Portalfelder (auch als periportale Felder bezeichnet). In diesen Periportalfeldern verläuft jeweils ein Ast der Leberarterie, der Pfortader und ein Gallengang (Ductus biliferus). Dies bezeichnet man als Glisson-Trias (Glissoneisches Dreieck). Zwischen den Leberzellen befinden sich die erweiterten Kapillaren der Leber (Lebersinusoiden). Diese Sinusoide sind von einem Endothel ausgekleidet und enthalten spezielle Makrophagen, die Kupffer-Zellen. Die radiären Sinusoide transportieren das Blut der Pfortader zusammen mit dem Blut aus der Leberarterie durch die Leberläppchen in Richtung des Zentrums der Läppchen, wo es von einer

Zentralvene (Vena centralis) aufgenommen wird. Die Zentralvenen vereinigen sich zu größeren Venen (Venea sublobulares) und schließlich zur Lebervene (Vena hepatica).

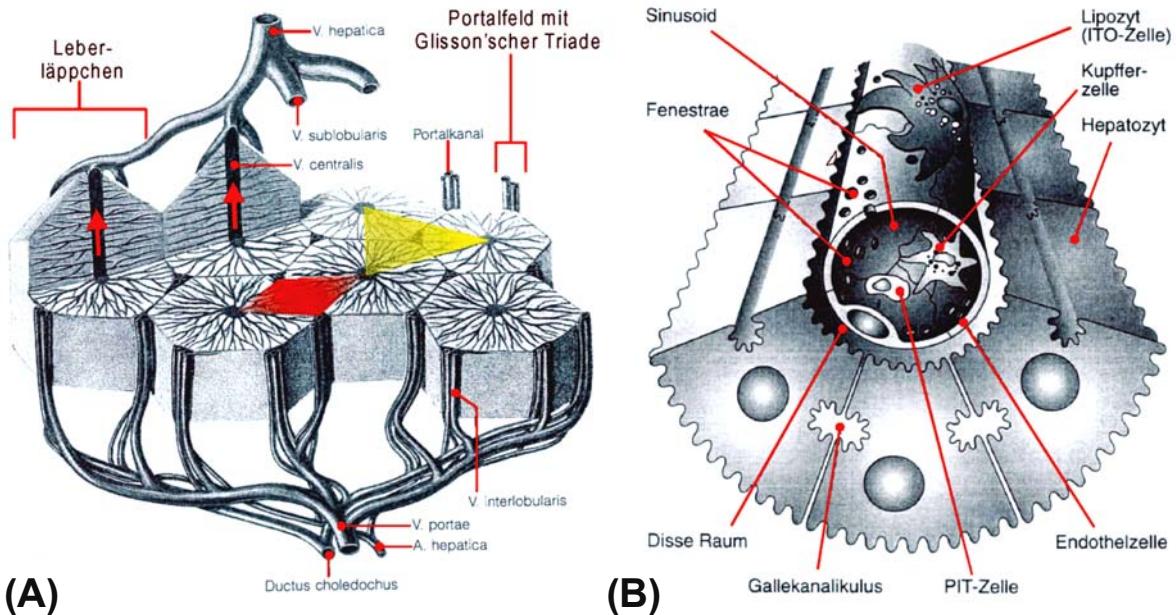


Abb. 3: Der innere Aufbau der Leber (Schema). (A) Räumliche Anordnung der Leberläppchen mit den afferenten und efferenten Leitungsbahnen. Die farbigen Flächen geben die funktionelle Gliederung der Leber in Portalläppchen (gelbes Dreieck) und Azinus (rotes Viereck) wieder. Rote Pfeile = Strömungsrichtung des Blutes durch die Zentralvenen. (B) Sinusoid mit benachbarten parenchymatischen Leberzellen (Hepatozyten) sowie den nicht parenchymatischen Zelltypen (siehe auch 2.2.4 (12)).

Den Spaltraum zwischen Lebersinusoiden und Leberzellen bezeichnet man als Dissé-Raum, in dem die eigentliche Entgiftung stattfindet. Im Dissé-Raum befinden sich als weitere nicht parenchymatische Zellen die hepatischen Sternzellen, oder Ito-Zellen, die Vitamin A speichern. Parallel zu den Sinusoiden verlaufen durch eine Einstülpung der Zellmembran benachbarter Hepatozyten die Gallenkanälchen (Canalici biliferi oder Canalici biliares). Gegen die Strömungsrichtung des Blutes fließt die Galle durch die Gallenkanälchen zu den Portalfeldern. Die Gallengänge werden von Gallengangsepithelzellen (Cholangiozyten) ausgekleidet. Aus den Gallengängen wird die Galle in die beiden Ductus hepatici dexter et sinister abgeleitet, die sich zum Ductus hepaticus communis vereinigen. Von hier aus gelangt sie über den Ductus choledocus in den Zwölffingerdarm (Duodenum) bzw. den Ductus cysticus zur Gallenblase (Vesica biliaris).

2.2.4 Zelluläre Bestandteile der Leber

In der Leber lassen sich grundsätzlich parenchymatische und nicht parenchymatische Zelltypen voneinander unterscheiden. Die Hepatozytenfraktion bildet dabei mit etwa 60-65 % an der Gesamtzellzahl der Leber und mit 77,8 % am Lebervolumen den größten Anteil. Sämtliche Zelltypen sind im Bereich der Sinusoide lokalisiert. Die nicht parenchymale Zellfraktion umfasst außer den Hepatozyten alle übrigen Zellen. Die Wand der Sinusoide (\varnothing 9-12 μm) setzt sich aus den Sinusoidendothelzellen zusammen, deren Ausläufer fenestriert (13) und auf denen die Kupffer-Zellen (auch Kupffer'schen Sternzellen genannt), die sessilen Lebermakrophagen, verankert sind. Neben den Kupffer-Zellen sind auch die Sinusoidendothelzellen in beschränktem Maße zur Phagozytose befähigt (zur Funktion der KCs: siehe auch 2.1.2). Zwischen den Hepatozyten und dem Sinusendothel liegt der sogenannte Dissé-Raum. Auf der dem Dissé-Raum zugewandten Seite des Sinusoids befinden sich die Ito-Zellen (auch Lipozyten, Fettspeicherzellen oder hepatische Sternzellen genannt), die neben ihrer Speicherfunktion für Vitamin A (14) wegen deren Lokalisation auf den Sinusoiden vermutlich auch eine Rolle bei der Regulation der Weite des Sinusendothels spielen (15). Außerdem haben sie eine entscheidende Funktion bei der pathologischen Fibrosierung der Leber, indem sie Komponenten der extrazellulären Matrix (Faserproteine, Glykoproteine, Proteoglykane und Integrine) bilden bzw. umsetzen. Ein weiterer Zelltyp sind die sogenannten PIT-Zellen, die im Lumen des Sinusoids und vereinzelt auch im Dissé-Raum lokalisiert sind. Diese natürlichen Killerzellen stammen vermutlich aus lymphatisch myelogenen Vorläuferzellen. Sie sind in Kooperation mit Kupffer-Zellen u.a. an anti-viralen und inflammatorischen Antworten beteiligt (16). Die Hepatozytenfraktion übernimmt den überwiegenden Teil der metabolischen Funktionen, die Biotransformation und Exkretionsfunktion der Leber. Hepatozyten bauen Hormone und Signalstoffe ab, regeln den Säure-Base-Haushalt und synthetisieren Komplementfaktoren sowie Akut-Phase-Proteine der Immunabwehr.

	Anteil an der Gesamzellzahl (%)	Anteil am Leber- volumen (%)
Zellen	100	84,1
Hepatozyten	60-65	77,8
Sinusoidendothelzellen	15-20	2,8
Kupffer-Zellen	8-12	2,1
Ito-Zellen	3-8	1,4
PIT-Zellen	< 2	
Extrazellulärer Raum		15,9
Sinusoide		10,6
Dissé-Raum		4,6
Gallenkanalikuli		0,4

Tab. 2: Prozentuale Anteile der Zelltypen und der extrazellulären Kompartimente am Lebervolumen (12).

2.2.5 Funktionen und Aufgaben der Leber

Die Leber nimmt eine zentrale Aufgabe für die primäre Verwertung der Nahrungsmittel wahr. Über die Pfortader wird sie mit den durch das Darmepithel resorbierten niedermolekularen Bausteinen der Nahrung versorgt, wobei hier die Nahrungsbestandteile abgebaut, zur Synthese körpereigener Substanzen verwendet, umgewandelt oder gespeichert werden (17). Sie übernimmt im Zuckerstoffwechsel des Körpers die Rolle eines sog. Glucostaten (18), in dem Glykolyse, Gluconeogenese sowie Glykogenauf- und -abbau auf komplexe Weise unter Beteiligung von Insulin, Glucagon und Adrenalin hormonell gesteuert werden. Weiterhin besitzt die Leber anabolische und katabolische Funktionen im Protein-, Lipid-, Aminosäure- und Stickstoffmetabolismus, sowie im Stoffwechsel der Vitamine und Spurenelemente. Für die Vielzahl an Aufgaben benötigt das Organ alleine rund 20 % des im Blut enthaltenen Sauerstoffs zur oxidativen mitochondrialen Energiegewinnung, da insbesondere die zahlreichen anabolischen Reaktionsschritte einen enormen ATP-Verbrauch besitzen. Die Bildung und Inaktivierung von (hormonalen) Signalstoffen ist eine weitere wichtige Funktion der Leber. So erfolgt hier die Umwandlung von Vorstufen der Hormone,

den so genannten Prohormonen spezifischer endokriner Drüsen, in ihren aktiven Zustand (z.B. Iodierung des Schilddrüsenhormons Thyroxin zu Trijodthyroxin) (19) und der Abbau der meisten Hormone (z.B. Steroidhormone der Nebenniere, Sexualhormone, Insulin, Glucagon und Somatotropin) (12).

Eine bedeutende Rolle spielt die Leber auch bei der unspezifischen Immunabwehr, da ca. 80-90 % der sessilen phagozytotischen Aktivität auf die in der Leber lokalisierten Kupffer-Zellen entfallen (siehe auch 2.1.2). Außerdem werden Akut-Phase-Proteine (proteaseinhibitorisch wirksame Proteine) durch parakrine Stimulation der Hepatozyten (durch Stimulation mit IL 6 aus den KCs) freigesetzt und die Bestandteile des Komplementsystems zu einem großen Teil in der Leber synthetisiert (20). Neben der Milz fungiert die Leber auch als das Organ der Blutspeicherung (21). Weiterhin ist sie, neben der Niere, die wichtigste exokrine Drüse des Körpers, da sie durch ihre Enzymausstattung in der Lage ist Endo- und Xenobiotika zu metabolisieren und über die Galle auszuscheiden. Sie übernimmt dabei die Aufgabe der Detoxifizierung des Körpers, wobei es allerdings im Zuge der Verstoffwechslung auch zu einer Toxifizierung kommen kann. Ein Beispiel des Abbaus endogener Stoffe ist die enzymatische Umwandlung des roten Blutfarbstoffes Hämoglobin über mehrere Stufen zum Bilirubin, welches nachfolgend über das Gallesystem in den Darm geleitet und mit dem Stuhl ausgeschieden wird. Zu den exogenen Stoffen gehören viele lipophile Substanzen, die mit der Nahrung in Form von Genuß- und Arzneimitteln oder als Umweltschadstoffe nach Resorption durch die Schleimhautepithelien über das Blut zur Leber gelangen. Die Biotransformation der Stoffe wird hauptsächlich von den Hepatozyten, in einigen Fällen auch von Sinusoidendothel- und Kupffer-Zellen, übernommen. Sie läuft in der Regel in 2 Phasen ab (Phase I+II). Bei den Reaktionen der Phase I erfolgt die Aktivierung der Verbindungen durch das Einfügen funktioneller Gruppen. Rein chemisch betrachtet handelt es sich hierbei um Oxidations-, Reduktions- und hydrolytische Reaktionen (22), woran cytosolische Enzyme (z.B. Alkoholdehydrogenasen), mikrosomale Flavin-haltige Monooxygenasen und v.a. Häm-haltige Cytochrom-P450-Enzyme beteiligt sind. In den Reaktionen der Phase II werden die aktivierte Verbindungen mit Glucuronat-, Sulfat- oder Acetylresten konjugiert, wodurch die Hydrophilie der Substanzen weiter erhöht und deren Ausscheidung aus dem Organismus erleichtert wird. Die hierbei enzymatisch beteiligten Transferasen (z.B. UDP-Glucuronosyltransferase, Gluthation-S-Transferase) sind allerdings nicht leberspezifisch, sondern kommen auch in anderen Organen vor.

2.2.6 Ätiologie und Pathologie von Lebererkrankungen

Lebererkrankungen sind sehr häufige Krankheiten im klinischen Alltag. Auf die auslösenden Noxen unterschiedlichster Art wie z.B. Alkohol, Fremdstoffe, Sauerstoffmangel, virale und nichtvirale Infektionen, Autoimmunprozesse oder hyperergische Reaktion auf Medikamente und Chemikalien reagiert die Leber mit unspezifischen Erkrankungsmustern wie z.B. einer (generalisierten) Entzündungsreaktion (Hepatitis). Langfristig können chronische Schädigungen über die Aktivierung der Ito-Zellen eine Ablagerung von Bindegewebsfasern verursachen, welche zur Fibrose und letztlich zur Zirrhose, dem irreversiblen Endstadium chronischer Lebererkrankungen, führen kann. Die Ito-Zellen werden bei diesem Prozess zunächst durch den Verlust interzellulärer Kontakte (z.B. mit Hepatozyten oder Sinusoidendothelzellen), durch Veränderung ihrer Verankerung in der extrazellulären Matrix sowie durch zahlreiche pro-inflammatorische, proliferationsfördernde und fibrogene Wachstumsfaktoren in Myofibroblasten umgewandelt. Diese Wachstumsfaktoren werden initial vorwiegend aus aktivierten Kupffer-Zellen, in geringerem Maße auch aus Lymphozyten, Sinusoidendothelzellen und Thrombozyten freigesetzt (23-28). Die Noxe, die zur Synthese und Freisetzung dieser Zytokine führt, trifft entweder die sezernierenden Zellen direkt (z.B. Endotoxin die KCs) oder zunächst die Hepatozyten, deren Nekrose Substanzen freisetzt, welche die fibrogenen Wachstumsfaktoren in den genannten Zellen induzieren. Der Myofibroblast ist gekennzeichnet durch die Ausbildung eines Aktin-Zytoskeletts, einer vermehrten Kontraktilität und Motilität und einer exzessiven Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix (Kollagen). Die Stimulation der Kollagensynthese führt, häufig kombiniert mit dessen verminderter Abbau (Fibolyse), zu einem Anstieg der extrazellulären Matrix. Ausgehend von einem Bindegewebsanteil von 1-2 % steigt dieser über das Stadium der Fibrose im voll ausgeprägten Krankheitsbild der Leberzirrhose auf einen Anteil von bis zu 50 % des Leberproteins (12). Neben der gesteigerten Fibrogenese sind weiterhin Parenchymnekrosen und Regeneratknoten, welche durch ein Nebeneinander von Gewebeuntergang und Regeneration entstehen, charakteristisch für das Krankheitsbild der Leberzirrhose. Die Folge ist eine gestörte Durchblutung der Leber und daraus resultierend eine Aufstauung des Blutes im Bereich der Pfortader (u.a. portale Hypertension, Aszites) und die Ausbildung von Sekundärkreisläufen (u.a. Ösophagusvarizen). Weiterhin kann die Leberfunktion hinsichtlich der Synthese- und

Entgiftungsfunktionen in sehr unterschiedlichem Maße beeinträchtigt sein. In der sogenannten Child-Pugh-Score-Klassifikation werden mehrere dieser Faktoren berücksichtigt und daraus ein Score berechnet (Tab. 3). Die resultierende Einteilung in die Stadien A bis C erlaubt eine Aussage über die Prognose der Erkrankung. So haben Patienten im Stadium C nach Child-Pugh eine 1-Jahr-Überlebensrate von nur ca. 50 % (29).

Die Inzidenz der Leberzirrhose in den Industrieländern beträgt etwa 250 pro 100000 Einwohner und Jahr, wobei das Verhältnis erkrankter Männer zu Frauen bei 2:1 liegt (29). Die geschätzten volkswirtschaftlichen Folgekosten belaufen sich hierbei allein in Deutschland auf mehrere Milliarden Euro pro Jahr (29).

Child-Pugh-Score der Leberzirrhose			
Parameter	Score-Punkte		
	1	2	3
Enzephalopathie	keine	Grad 1-2	Grad 3-4
Aszites	nicht	leicht	mittelgradig
Bilirubin [μ mol/l]	< 35	35-51	> 51
bei PBC, PSC	< 69	69-170	> 170
Albumin [g/l]	> 35	28-35	< 28
Quick [%]	> 70	40-70	< 40
Einteilung nach Addition der Score-Punkte der einzelnen Kategorien: Child-Pugh-Stadium A: 5-6 Punkte, B: 7-9 Punkte, C: 10-15 Punkte			

Tab. 3: Child-Pugh-Score-Klassifikation bei der Leberzirrhose.

2.2.7 Lebertransplantationen

Die Lebertransplantation (LTx) hat in den letzten 20 Jahren immer größere Fortschritte gemacht und gilt heute als Therapie der Wahl für Lebererkrankungen im Endstadium. Den Hauptanteil bilden hierbei mit etwa 61 % Leberzirrhosen unterschiedlichster Ätiologie. Weitere Indikationen zur LTx sind u.a. leberotypische Stoffwechselerkrankungen (z.B. Morbus Wilson), Leberkarzinome (HCC) sowie das akute Leberversagen. Obwohl sich die LTx in den letzten Jahren zu einem Standardverfahren entwickelt hat, stellen die schlechte Primärfunktion, Infektionen und Abstoßungsreaktionen nach wie vor große Probleme dar und bilden die Hauptursachen für eine Mortalitätsrate von 15-25 % in den ersten beiden Jahren nach der Transplantation (30-34).

Die Anfänge der Lebertransplantation wurden 1963 von Thomas E. Starzl von der Northwestern University of Chicago gemacht (35). Sein erster Patient, ein dreijähriger Junge mit Gallengangatresie (angeborenes Fehlen der Gallengänge mit intrahepatischen Rückstau der Galle), verstarb allerdings während der Operation an Blutverlust infolge unkontrollierbarer Gerinnungsstörungen. Erst im Jahre 1967 gelang es Starzl die erste erfolgreiche Lebertransplantation mit einer Überlebensdauer des Patienten von mehr als einem Jahr durchzuführen (36). Zwei Jahre später war es Alfred Gütgemann an der Chirurgischen Klinik der Universität Bonn, welcher die erste Leber in Deutschland transplantierte (37). In der Folge lag die 1-Jahr-Überlebensrate der Patienten jedoch bei den damals verwendeten Immunsuppressiva (Mercaptopurin, Azathioprin, Prednison, antilymphocytische Globuline) zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen des Organismus bei maximal 30 % (38). Der Durchbruch auf diesem Gebiet wurde mit der Einführung von Cyclosporin A erreicht, dessen immunsuppressiver Effekt Ende der 1970-er experimentell nachgewiesen wurde (39). In den Folgejahren konnte die Kurzzeitüberlebensrate (≤ 1 Jahr) nach einer Lebertransplantation auf 80–90 % gesteigert werden (40). Zusätzliche Verbesserungen der Organverträglichkeit wurden durch die Einführung von Tacrolimus (FK 506) (41), Mycophenolat Mofetil (MMF) (42) und Rapamycin (Sirolimus) (43) erzielt. Außerdem wurde durch die Entwicklung von speziellen Operationstechniken die Komplikationsrate bei Transplantationen deutlich verringert (44; 45). Bis zum Jahr 2005 wurden in Deutschland 11949 Lebertransplantationen an 22 Transplantationszentren durchgeführt. Allein im Jahr 2005 gab es insgesamt 888 Lebertransplantationen nach postmortaler Organspende. Abb. 4 zeigt, dass der Bedarf wegen der Knappheit transplantierbarer Lebern jedoch nicht gedeckt werden konnte (Quelle: Deutsche Stiftung Organtransplantation, <http://www.dso.de>).

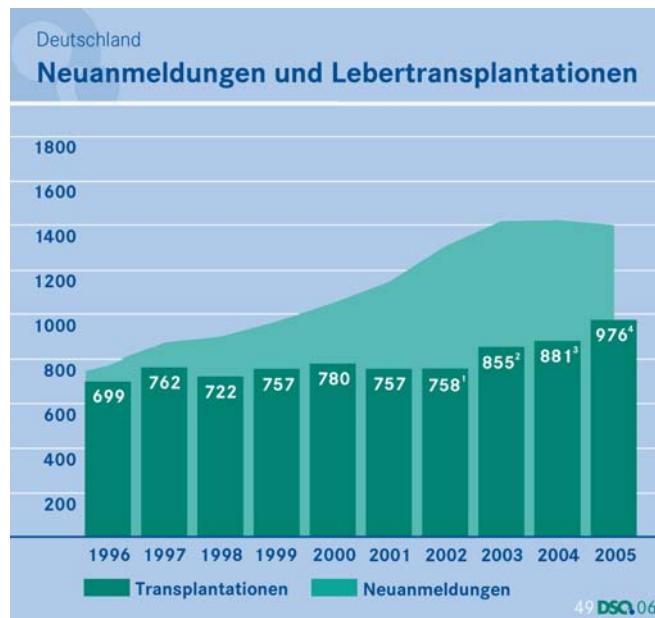


Abb. 4: Neuanmeldungen im Vergleich zu durchgeföhrten Lebertransplantationen im Zeitraum von 1996 bis 2005 (Quelle: Deutsche Stiftung Organtransplantation, <http://www.dso.de>).

Die Diskrepanz zwischen Angebot transplantierbarer Lebern und deren Nachfrage hat zu der Entwicklung geföhrt, die Kriterien bei der Transplantatauswahl zu erweitern und nach weiteren Möglichkeiten zum standardisierten orthotopen Organaustausch (OLT) zu suchen. Zur Erhöhung der Gesamtzahl zur Verfügung stehender Transplantate werden mittlerweile Spender mit einem Alter zwischen 70 und 80 Jahren berücksichtigt, obwohl solche Transplantate eine verminderte postoperative Funktionsfähigkeit aufweisen (46). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, ein Transplantat im sogenannten „Split-Liver“-Verfahren auf einen Erwachsenen und ein Kind zu transplantieren, wobei die erwachsene Person den rechten Leberlappen und das Kind den linken Lobus bzw. das linke laterale Segment erhält.

Die partielle Transplantation von Lebersegmenten von Lebendspendern stellt eine weitere Alternative dar, wobei die Spender in der Regel nahe Verwandte des Empfängers sind. Derartige Eingriffe wurden erstmals 1989 durchgeführt (47) und die Zahl der Lebendspender-Transplantationen nahm in den letzten Jahren v.a. in den USA und Japan mit sehr guten Prognosen für die Patienten kontinuierlich zu (48; 49). Die erwartete Verringerung der Abstoßungsrate durch die hohe Histokompatibilität des Transplantats eines unmittelbaren Verwandten konnte jedoch nicht erreicht werden (50).

Ein weiterer vielversprechender Therapieansatz, die Regeneration des Organs durch Transplantation isolierter humaner Leberzellen (v.a. Hepatozyten) zu erreichen, ist bisher über einige Einzelfallstudien bzw. Studien mit kleinem Patientenkollektiv nicht hinausgekommen (51). Eine erfolgreiche Etablierung dieser Methode würde die Überlebensprognose der Patienten verlängern und die Zahl der benötigten Transplantatlebern reduzieren. Es würde hiermit u.a. auch die Möglichkeit bestehen genetisch veränderte Zellen in die Leber einzuschleusen, um damit einen protektiven Effekt bei verschiedenen Leberschädigungen zu erzielen.

2.2.8 Ischämie- und Reperfusionsschaden bei Lebertransplantationen

Beim Verlauf einer Lebertransplantation kommt es zwangsläufig zu einer gewissen Schädigung des Spenderorgans. Insgesamt werden hierbei 4 Phasen der Schädigung unterschieden, nämlich die Schädigung im Spenderorganismus vor der Organentnahme, die Schädigung während der kalten und warmen Ischämie und den Reperfusionsschaden. Die 3 letzten Komponenten werden auch als Ischämie-/Reperfusionsschaden zusammengefasst, welcher wesentlich die postoperative Organfunktion beeinflusst. Der Grad der Schädigung ist teilweise so schwer, dass einige Spenderlebern versagen und eine sofortige Retransplantation erforderlich wird (primäre Nichtfunktion), bzw. die Funktion so schlecht ist, dass eine längere Behandlung des Patienten auf der Intensivstation nötig wird (primäre Dysfunktion) (12).

Durch die Unterbrechung der Blutzufuhr (Ischämie) und damit der Sauerstoffversorgung tritt innerhalb kürzester Zeit eine Hypoxie der Leber ein. Sie löst im Hepatozyten zunächst Anpassungsvorgänge in Form von veränderter Gen- und Proteinexpression aus (52). Es kommt zur Induktion von Hitzeschock-, Glukose-regulierten und Hypoxie-assoziierten Proteinen, Expression von Fibronectin, verstärkter Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Expression von immediate-early-Genen (u.a. c-fos, c-myc, c-jun), Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z. B. NFkB), Induktion von Proteasen und Proteaseinhibitoren (52).

Ursache des hypoxischen Zellschadens ist v.a. die aufgrund des Sauerstoffmangels gestörte Energiebilanz der Zelle und ein Zusammenbruch der Homöostasemechanismen. Die Bildung von ATP durch oxidative Phosphorylierung im Cytochromsystem der Mitochondrien ist nicht mehr möglich und noch vorhandenes ATP wird schnell

aufgebraucht. Den ATP-abhängigen Ionenpumpen in der Zellmembran (Na^+/K^+ -Pumpe, Ca^{2+} -Pumpe) fehlt folglich die nötige Energie, wodurch ihre Aktivität gehemmt wird. Die resultierende intrazelluläre Akkumulation von Na^+ und Ca^{2+} senkt das Membranpotentials (53) und durch den Einstrom von Cl^- -Ionen und Wasser entlang eines Konzentrationsgradienten entsteht ein Zellödem und eine Schwellung von Organellen (54; 55). Die höhere cytosolische Ca^{2+} -Konzentration kann auf verschiedenen Wegen, z.B. durch die Aktivierung hydrolysierender Enzyme wie Phospholipasen und Proteasen, das Organ schädigen. Weiterhin führt die Umstellung des Stoffwechsels zugunsten der anaeroben Glykolyse zur intrazellulären Ansammlung von Laktat und einer Erniedrigung des pH-Wertes. Durch Nukleotidhydrolyse wird die zelluläre Azidose verstärkt, weshalb lysosomale Membranen destabilisiert und der mitochondriale pH-Gradient gestört werden und es folglich zu einer Zellschädigung kommt (54; 56).

Die Vielzahl der Schädigungen bewirken eine Alteration des Zytoskeletts und von Membranen, was zu Ausstülpungen auf der Zelloberfläche (sogenannten „Blebs“) und letztendlich zum Zelltod führen kann (57).

Während der Reperfusion kommt es zur verstärkten Freisetzung von hochtoxischen Sauerstoffmetaboliten (58). Ursache hierfür ist u.a. die bei anhaltender Hypoxie in der Ischämiephase gesteigerte Umwandlung von Xanthinhydrogenase (XD) in die Xanthinoxidase (XO) (59-63), sowie die intrazelluläre Akkumulation von Hypoxanthin unter dem Verbrauch von ATP ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}$). Die XO befindet sich in den Hepatozyten und Endothelzellen und katalysiert in der sauerstoffreichen Reperfusion den oxidativen Abbau von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zur Harnsäure unter der Bildung von freien Sauerstoffradikalen (O_2^- , HO^- , HO_2^- , siehe Abb. 5). Freie Sauerstoffradikale sind instabile, besonders reaktionsfähige Moleküle, die in der Lage sind, nahezu alle molekularen Komponenten der Zelle zu oxidieren und über schwer kontrollierbare Kettenreaktionen zu schädigen. So greifen sie mitochondriale und zelluläre Membranen an, wodurch sie eine Schädigung der Hepatozyten und sinusoidalen Endothelzellen bewirken (64-67).

Sie aktivieren Kupffer-Zellen, die ihrerseits pro-inflammatorische Zytokine (z.B. $\text{TNF}\alpha$, IL 1, IL 6, IL 12, PAF) und über die membranständige NADPH-Oxidase weitere freie Sauerstoffradikale ausschütten (68; 69). $\text{TNF}\alpha$ induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. P-Selektin) auf Gefäßendothelien und stimuliert die Chemotaxis von Leukozyten, vornehmlich polymorphkernigen neutrophilen Granulo-

zyten und Lymphozyten (70). Die Leukozyten binden an die Endothelzellen und sammeln sich in den Lebersinusoiden an, weshalb die hepatische Mikrozirkulation gestört wird. Dies wird durch eine gleichzeitig stattfindende Thrombozytenadhäsion verstärkt (70-72). Die Leukozyten setzen ihrerseits ebenfalls toxische Metabolite wie Sauerstoffradikale frei und tragen dadurch zur weiteren Schädigung des Organs bei.

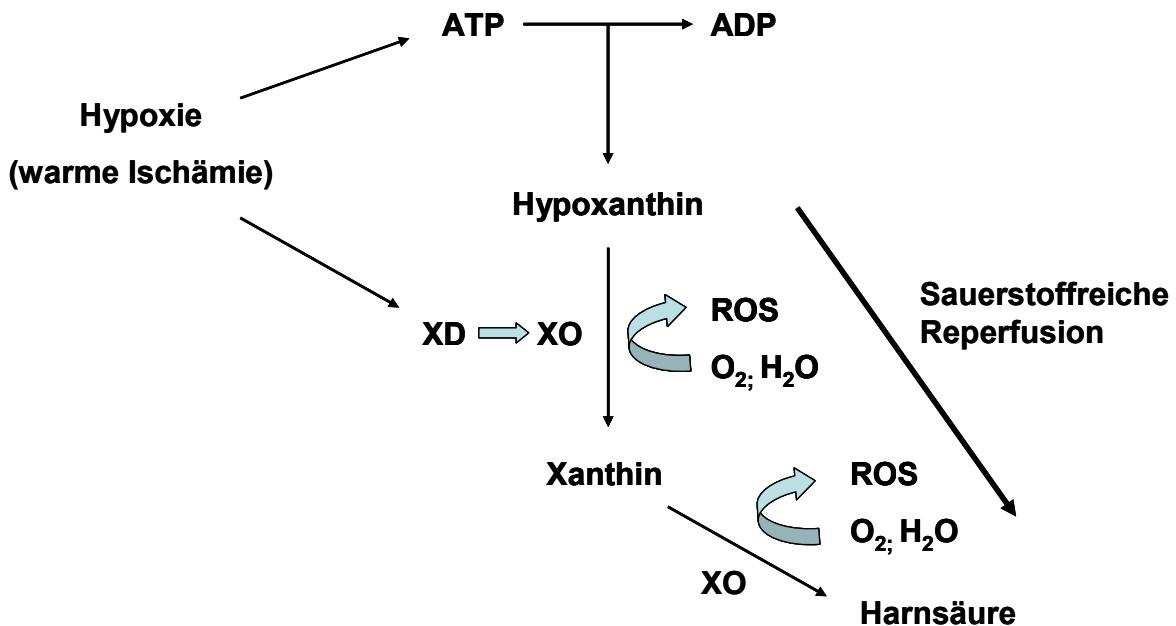


Abb. 5: Initialer Ischämie-/Reperfusionsschaden. Entstehung freier Sauerstoffradikale durch Oxidation von Hypoxanthin zur Harnsäure.

Die initiale Reperfusionsphase (1-2 h) ist gekennzeichnet durch eine oxidative Zellschädigung, hervorgerufen durch Hepatozyten, aktivierte Kupffer-Zellen und der sinusoidalen Akkumulation der Leukozyten. Adhäsion und Infiltration neutrophiler Leukozyten bestimmen die späte Reperfusionsphase (6-24 h), die im Sinne einer postischämischen Entzündungsreaktion schwere parenchymatöse Zellschäden bewirken kann.

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer LTX steht im Tiermodell neben der klassischen Transplantation ein etabliertes akutes Schädigungsmodell der Leber zur Verfügung, bei dem der (warmer) Ischämie-/Reperfusionsschaden imitiert wird. Dies wird durch das Abklemmen der Leberarterie und eines Hauptastes der Portalvene über einen Zeitraum von einer Stunde erreicht. Die beiden Gefäße versorgen die 3 oberen Leberlappen der Ratte, welche rund 70 % des Gesamtvolumens des Organs darstellen (73). Nach dem Abklemmen und der Reperfusion der Leber mit oxygeniertem Blut wird dann der beschriebene oxidative Stress induziert.

2.3 Die Rolle von Interleukin 10 als anti-inflammatoryisches Zytokin

Unter Homöostasebedingungen besteht ein Gleichgewicht im Körper zwischen inflammatorischen und anti-inflammatoryischen Mediatoren. Die Präsenz von pro-inflammatoryischen Zytokinen muß folglich nicht unbedingt zu Entzündungsprozessen führen, wenn sie durch anti-inflammatoryische Gegenspieler ausgeglichen wird. Eine Reihe von Zytokinen, wie z.B. IL 4, IL 13, TGF β und v.a. IL 10, besitzen entzündungshemmende Eigenschaften (74).

IL 10 wird auch als CSIF (cytokine synthesis inhibitory factor), MCSF III (mast cell growth factor III) oder B-TCGF (B cell-derived T cell growth factor) bezeichnet. Das Gen für IL 10 ist auf Chromosom 1q lokalisiert, hat eine Größe von 4,7 kb und besitzt 5 Exone und 4 Introne. Es kodiert für ein 18 kDa homodimeres Protein, das hauptsächlich von CD4 $^{+}$ T-Zellen und aktivierten Monozyten/Makrophagen produziert wird. IL 10 ist mit seinen anti-inflammatoryischen Eigenschaften von herausragender Bedeutung für den Organismus, indem es die Produktion von pro-inflammatoryischen Zytokinen wie z.B. IL 1, IL 6, IL 8, GM-CSF oder TNF α hemmt. Des Weiteren vermindert es die Bildung von Stickstoffoxid und reaktiven Sauerstoffverbindungen (75; 76), die Eicosanoid-Synthese (77), die Expression von Adhäsions-Molekülen (78) und die Synthese von Chemokinen (79; 80).

IL 10 wird normalerweise in der Leber nicht exprimiert, seine Synthese kann aber durch Kupffer-Zellen in Fällen einer Leberschädigung oder durch Endotoxin bzw. durch das vermehrte Vorliegen von pro-inflammatoryischen Zytokinen schnell hochreguliert werden (81; 82). Ferner konnte gezeigt werden, dass IL 12, IFNy und IL 4 die IL 10-Synthese steigern. Seine Fähigkeit in verschiedenen Leberschädigungsmodellen (Endotoxin, Galaktosamin u.a.) einen protektiven Effekt zu besitzen wurde *in vivo* bereits demonstriert (81; 82). Die molekularen Mechanismen, die dieser anti-inflammatoryischen Wirkung zugrunde liegen, sind jedoch nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt.

IL 10 vermittelt seine Effekte über einen spezifischen Oberflächenrezeptor, einen Zytokinrezeptor Klasse II. Der IL 10-Rezeptor-Komplex ist ein Tetramer und besteht aus 2 IL 10-R1-Ketten, an denen der Ligand bindet und 2 IL 10-R2-Ketten, die essentiell für die Signaltransduktion sind. Die Bindung des homodimeren Zytokins an seinen Rezeptor-Komplex induziert in den Zellen eine Phosphorylierung der IL 10-R1-assoziierten JAK1 (Janus Kinase 1) und der IL 10-R2-assoziierten TYK2 Kinasen

(83; 84). Diese Kinasen phosphorylieren dann spezifisch Tyrosinreste an der intrazellulären Domäne der IL 10-R1-Kette. Die phosphorylierten Tyrosinreste und ihre flankierenden Peptidsequenzen dienen als temporäre Andockstellen für den latenten, zytosolischen Transkriptionsfaktor STAT3. STAT3 bindet transient über seine SH2 (Src homology 2) Domäne an diese IL 10-R1-Kette und wird seinerseits durch die Rezeptor-assoziierten JAKs phosphoryliert und aktiviert. Nach der Aktivierung löst sich der Transkriptionsfaktor vom Rezeptor und dimerisiert mit anderen phosphorylierten STAT3 Molekülen. Es erfolgt eine Translokation in den Kern, wo sie mit hoher Affinität an SBEs (STAT binding elements), die sich in den Promotersequenzen der verschiedenen IL 10-abhängigen Gene befinden, binden. Eines dieser Gene ist SOCS-3 (suppressor of cytokine signalling-3), ein Mitglied der neu identifizierten JAK/STAT-Inhibitorgene. Die Fähigkeit von IL 10 sehr schnell die Expression von SOCS-3 zu induzieren, kann zumindest zum Teil seine anti-inflammatoryischen Eigenschaften erklären. Untersuchungen haben allerdings belegt, dass der JAK/STAT-Signalkaskadeweg nicht alleine für die entzündungshemmenden Eigenschaften verantwortlich ist (85).

So wird durch IL 10 auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFkB und folglich auch die Expression von pro-inflammatoryischen Zytokinen gehemmt (86). Studien über den zugrunde liegenden Mechanismus haben gezeigt, dass IL 10 über mindestens 2 verschiedene Wege die Aktivierung von NFkB hemmen kann. Zum einen kann IL 10 die I kB Kinase inhibieren (87) oder zum anderen die Bindung von NFkB an die DNA blockieren (88).

Von Bedeutung für die entzündungshemmenden Eigenschaften von IL 10 scheint zusätzlich auch die Induktion des Enzyms Hämoxigenase 1 (HO 1) zu sein. Bis heute sind 3 Isoformen der HO identifiziert worden, die den oxidativen Abbau von toxischem Häm, einem Eisenkomplex aus Protoporphyrin IX (89), im biologischen System koordinieren. Neben der durch oxidativen Stress induzierbaren HO 1 aus der Familie der Hitze-Schock-Proteine (HSP 32) (90) gibt es noch die konstitutiv exprimierte HO 2 (91) und die erst kürzlich identifizierte HO 3 (92). Diese membrangebundenen Proteine sind Produkte unterschiedlicher Gene und in den Organen unterschiedlich verteilt (91; 93). So wurde die höchste Konzentration von HO 1 in der Milz und in der Leber gemessen, während HO 2 im Gehirn und im Testis am höchsten exprimiert ist (91). Wie kein anderes Enzym, reagiert die HO 1 extrem empfindlich auf verschiedene Stressoren wie z.B. I/R, Hypoxie und Hyperoxie (94),

inflammatorische Zytokine (94-97), Endotoxin (98; 99), Häm (100; 101), Metalle (102), Hypothermie und Hyperthermie (103) sowie die portale Hypertension. Neue Untersuchungen haben gezeigt, dass IL 10 die Expression der HO 1 über einen MAPKinase-Signalkaskadeweg (p38 MAPKinassen) induziert (85). Häm wird hauptsächlich aus dem Hämoglobin alternder oder geschädigter Erythrozyten, Myoglobin und Cytochromen freigesetzt und stellt für die Zelle ein Prooxidanz und eine potentielle Quelle freier Radikale dar. Die Hämoxigenase katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei dessen Degradation und regelt dadurch die zelluläre Konzentration des Substrats. Als Katabolite entstehen 3 biologisch aktive Produkte, das Biliverdin, Eisen und Kohlenmonoxid (CO, siehe Abb. 6). Biliverdin wird durch die Biliverdinreduktase weiter zum Bilirubin, einem potennten Antioxidanz, Antimutagen und Anti-Komplementagenz abgebaut (104; 105). Freies Eisen wird für intrazelluläre Stoffwechselvorgänge verwendet bzw. durch Ferritin, dem Eisenspeicherprotein des Körpers, gebunden. Ferritin besitzt ebenfalls antioxidative Effekte, was zum Teil durch die Bindung von Eisen erklärt werden kann, da überschüssiges Eisen zu schweren Entzündungsreaktionen und Fibroseprozessen führen kann (106). CO, das dritte Abbauprodukt, wird jedoch als die Verbindung angesehen, die den Hauptteil der entzündungshemmenden Eigenschaften vermittelt (85; 107-109). So verminderte eine Komplexierung von CO durch Hämoglobin in Makrophagen signifikant die inhibitorischen Eigenschaften von IL 10 auf die LPS-induzierte TNF α -, NO- und MMP9-Expression (13). Weiterhin wurde in Tiersversuchen mit IL 10 und ZnPP (Zink-Protoporphyrin, spezifischer, kompetitiver Inhibitor von HO 1) an Mäusen gezeigt, dass die Beatmung mit CO die protektiven Eigenschaften von IL 10 wieder voll herstellte (85). Der genaue Mechanismus des CO-vermittelten Effektes ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

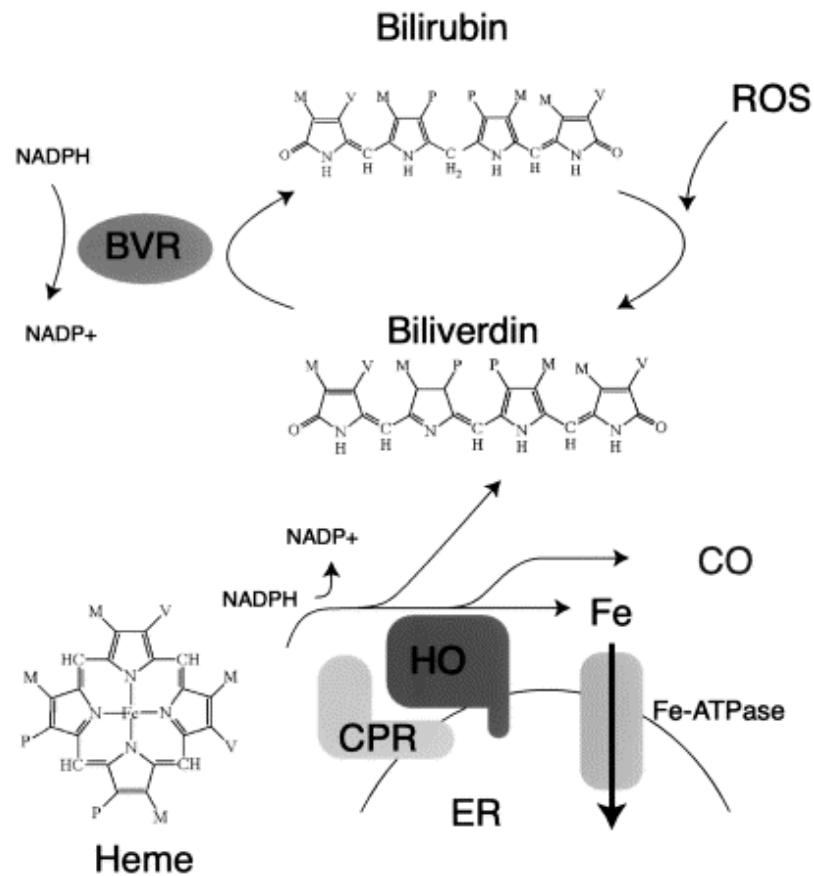


Abb. 6: Abbau von Häm durch aktivierte Hämoxigenase. Die Expression der Hämoxigenase 1 wird durch IL 10 induziert. (CPR: NADPH Cytochrom P450 Reduktase, ER: Endoplasmatisches Retikulum) (110).

3 Zielsetzung

Die Aktivierung von Kupffer-Zellen (KCs), den lokalen Gewebsmakrophagen der Leber, spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese zahlreicher, inflammatorischer Lebererkrankungen. Hierbei ist dieser Zelltyp, durch die Interaktion mit anderen hepatischen Zellen u.a. über die Expression physiologisch aktiver Substanzen, sowohl direkt als auch indirekt, an der lokalen Gewebsschädigung beteiligt. Zur weiterführenden Charakterisierung dieser Beteiligung und der patophysiologischen Folgen der Zellaktivierung sollten Kupffer-Zellen in einem akuten Schädigungsmodell der Leber (Ischämie-Reperfusionsmodell) der Ratte transplantiert werden. Basierend auf Vorarbeiten war das primäre Ziel der Studie zunächst eine Optimierung der Repopulation von KCs in einem Tiermodell, wobei u.a. auch beabsichtigt wurde, transduzierte KCs einzusetzen, die nach adenoviralem Gentransfer und anschließender Transplantation in den Empfänger, im Sinne eines „drug-targetings“, die spezifischen Genprodukte lokal in der Leber exprimieren. Nach erfolgreicher Etablierung der Methode, sollten im Tiermodell die Effekte der Repopulation von genetisch veränderten KCs in den Lebern der Empfängertiere evaluiert werden. Die zielgerichtete, lokale Expression eines therapeutisch wirksamen Proteins (hier Interleukin 10) durch Repopulation transduzierter Kupffer-Zellen in der Leber hat seiner systemischen Verabreichung gegenüber den Vorteil, geringere Nebenwirkungen auf den Gesamtorganismus zu besitzen. Die wesentliche Einschränkung des alleinigen Einsatzes eines genetisch modifizierten viralen Vektors liegt in dessen Unspezifität. So lässt sich das Spektrum der Zielzellen und die möglichen Auswirkungen auf den Organismus nicht vorhersagen. Die Folgen der exklusiv in Kupffer-Zellen erhöhten Expression lassen weiterführende Rückschlüsse auf die Bedeutung des verwendeten Targetgens sowie der Kupffer-Zellen bei der Pathophysiologie innerhalb eines Leberschädigungsmodells zu. Gemäß unserer Hypothese sollte eine, durch genetisch veränderte KCs induzierte, selektive Überexpression des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin 10 einen protektiven Effekt bei einem Ischämie-/Reperfusionsschaden der Leber vermitteln.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien und Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind mit deren Bezugsquellen in folgenden Tabellen zusammengefasst:

4.1.1 Materialien und Geräte für die Zellisolation

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Dextrose	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Domitor (0,2 ml = 0,05 mg Medetomidin)	Pfizer, Karlsruhe
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Fentanyl	Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe
Filter für Zellsuspension	Aesculap, Tuttlingen
HCl (1 mol/l)	Merck, Darmstadt
Heidelberger Verlängerung	Fresenius AG, Bad Homburg
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Kollagenase Typ IV	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Midazolam	Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaCl, 0,9 % steril	Braun, Melsungen
NaCl, Pulver	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
Nassrasierer	Hartmann AG, Heidenheim
Percoll [®]	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Perfusionsanlage Ismatec IPC	Ismatec, Wertheim
Stericups	Millipore GmbH, Schwalbach
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Urinbecher	Sarstedt, Nürnbrecht

Venenverweilkanüle (Katheter, 20 G)	Johnson & Johnson, New Brunswick, USA
-------------------------------------	---------------------------------------

4.1.2 Materialien und Geräte für die Zellkultur

Brutschrank Binder Serie CB	Binder, Tuttlingen
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
DMEM Kulturmedium	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Durchlichtmikroskop	E.Leitz, Wetzlar
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Gewebe-Kulturflaschen	Greiner, Solingen
HEPES-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Kryoröhrchen	Nunc GmbH, Wiesbaden
Multiwell Kulturplatten	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin 10,000 U / Streptomycin 10 mg / Amphotericin B 25 µg (P/S/A)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Petripermplatten	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
RPMI 1640 Kulturmedium	Biochrom, Berlin
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Osterode
Trypsin mit EDTA 10 x	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

4.1.3 Materialien und Geräte für die Durchflusszytometrie

Trägerflüssigkeit Isoton® II	Coulter, Immunotech, Krefeld
Durchflusszytometer Coulter EPICS®XL-MCL™®	Coulter, Immunotech, Krefeld
Polystyren Röhrchen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

4.1.4 Sonstige Materialien

Agarose High Resolution	Roth, Karlsruhe
BCA (bicinchoninic acid solution)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
BiomaxFilm, 20,3 cm x 25,4 cm	Kodak, Stuttgart-Wangen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
CsCl ₂	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Cu ²⁺ (copper (II) sulfat pentahydrate solution)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Cyclosporin A	Ratiopharm, Ulm
DAKO Cytomation Pen	DAKO Cytomation, Hamburg
Deckgläschen (24 mm x 60 mm)	Laborzenter, Nürnberg
Deoxycholsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Dialysekassette	Pierce, Rockford, USA
ECL Plus Western Blotting Detection System	Amersham Biosciences, Freiburg
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin, gelb	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fluoresbrite TM plain YG 1,0 micron microspheres	Polysciences Inc., Warrington, USA
GdCl ₃	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Gefäßklemmen	FST GmbH, Heidelberg
Glaswaren (verschiedene)	Schott, Mainz
Karbonussuspension India ink	Bactidrop, Remel, USA
Lipopolysaccharid (LPS) von <i>Escherichia coli</i> 055:B5	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Mayer's Hematoxylin Färbelösung	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylgrün	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Nitrocellulose Membran, 0,45 µM pore size	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Bis-Tris Gel, 4-12 %; 1,0 mm x 10 Well	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20 x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Reducing Agent (10 x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE SDS Sample Buffer (4 x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Transfer Buffer (20 x)	Invitrogen, Karlsruhe
Objektträger, Superfrost Plus, 25 mm x 75 mm x 0,1 mm	Menzel-Glässer, Braunschweig
Parafilm M (250 ft x 4 in)	Pechiney Plastic Packaging Inc., Neenah, USA
Pasteurpipetten, 5 ml und 10 ml	Brand, Wertheim
peqGOLD 100 bp DNA-Leiter	Peqlab, Erlangen
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Polyallomer Röhrchen	Beckman GmbH, Krefeld
Polyoxyethylenesorbitan Monolaurat (Tween-20)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Proteaseinhibitor (Tablette)	Boehringer, Mannheim
Reaktionsgefäße, 1 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml	Falcon, Heidelberg
Resorufin-β-D-Glucosid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
RNA 6000 LabChip	Ambion, Austin, USA
SeeBlue Plus2 (Standard), pre-stained, 191-11 kDa	Invitrogen, Karlsruhe
Stickstoff, flüssig	Linde Technische Gase, Höllriegelskreuth
Tissue tek®	Sakura-Finetec Europe, Zoeterwoude, Niederlande

Triton X 100	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Xylol	Merck, Darmstadt

4.1.5 Sonstige Geräte

Abi Prism 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Forster City, USA
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent, Böblingen
Autoklav (Sanoclav)	Wolf, Geislingen
autoMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Automatische Einbettvorrichtung Hyper-center	Shandon, Frankfurt/Main
Carbogen	Linde Technische Gase, Höllriegelskreuth
Digitale Bildverarbeitungsanlage (Spot RT Color)	Visitron, Planegg
Eismaschine, UBE 125	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Biosystems, Freiburg
Entwickler Curix 60	Agfa, Leverkusen
Kryotom, Frigocut 2800E	Leica, Wetzlar
Laborwaage, SC2020	Ohaus, Giessen
Magnetrührer, IKAMag REO	Heidolph, Kehlheim
Mikroskop (DM RBE)	Leica, Wetzlar
NanoDrop ND-1000	Peqlab, Erlangen
Nicool LM 10	Air Liquid, Düsseldorf
OWL Separation Systems	Peqlab, Erlangen
PCR-Thermocycler Gene Amp® PCR Systems	Applied Biosystems, Forster City, USA
Phasenkontrastmikroskop Zeiss Axiovert 25	Carl Zeiss GmbH, Jena
pH-Meter	Wiss.Tech.Werkst., Weilheim
Pipetten (bis 10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage, Milli-Q-Plus	Ultra Pure Water Systems, Billerica, USA
Schüttler REAX 2	Heidolph, Schwabach

SW 71 TI Rotor	Beckman GmbH, Krefeld
Thermomixer, HTM 130	HLC (HEAP Laborconsult), Göttingen
Ultrazentrifuge Optima	Beckman GmbH, Krefeld
Vortex Mixer, Genie 2	Heidolph, Kehlheim
Zentrifuge Heraeus fresco	Kendro, Langenselbold

4.1.6 Fertigkombinationen von Biochemikalien

ELISA Kits für Ratte u. human IL 6, human IL 10, Ratte u. human TNF α	BD Biosciences, Heidelberg
Picogreen Assay	Molecular Probes, Karlsruhe
Reverse Transcription System Kit	Promega, Mannheim
RNase free DNase I Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen, Hilden

4.1.7 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

Oligonukleotide für die qualitative PCR:

Primer:	Basensequenz:
Beta-Actin forward rat	5' GGG TGT GAT GGT GGG TAT G 3'
Beta-Actin reverse rat	5' ATG GCT GGG GTG TTG AAG 3'
EGFP forward	5' AAC GGC CAC AAG TTC AGC GT 3'
EGFP reverse	5' TTC TCG TTG GGG TCT TTG CT 3'
IL10 forward human	5' CCT GTA ATC CCA GCA CTT TTG 3'
IL10 reverse human	5' ACT GCA ACT TCC ATC TCC TG 3'

Oligonukleotide für die quantitative PCR:

Primer:	Basensequenz:
Beta-Actin forward rat	5' GGG TGT GAT GGT GGG TAT G 3'
Beta-Actin reverse rat	5' ATG GCT GGG GTG TTG AAG 3'
IL10 forward human	5' GCC TAA CAT GCT TCG AGA TCT 3'
IL10 reverse human	5' GGG CAT CAC CTC CTC CA 3'

4.1.8 Antikörper

Antikörper	Konjugat	Spender	Klon	Hersteller
Anti GFP	ohne	Ziege	keine Angabe	Rockland Immunochemicals, Philadelphia, USA
Anti goat	HRP	Affe	keine Angabe	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
Anti human CD 33	PE	Maus	keine Angabe	Immunotech, Krefeld
Anti human IL 10	ohne	Ziege	keine Angabe	R&D Systems, San Diego, USA
Anti rat-CD 163	ohne	Maus	ED2	Acris Antibodies, Hiddenhausen
Anti rat-CD 68	FITC	Maus	keine Angabe	Serotec GmbH, Düsseldorf
Maus IgG 1	FITC	Ziege	keine Angabe	Serotec GmbH, Düsseldorf
Goat anti-mouse IgG	Magnetische Beads	Ziege	keine Angabe	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Maus IgG1 κ	ohne	Maus	keine Angabe	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

4.1.9 Lösungen, Puffer und Medien

Aufgeführtes Wasser hatte Millipore-Qualität.

Lösungen für die Makrophagenisolation:

HBSS- Puffer (10 x):	NaCl	80 g
	KCl	4 g
	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	0,91 g
	KH ₂ PO ₄	0,60 g
	Dextrose	10 g
	EGTA	1,90 g
	H ₂ O	ad 1000 ml

HBSS- Puffer (1 x):	Konzentrat (10 x)	100 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
	NaHCO ₃	0,35 g
Sterilfiltriert und auf pH 7,2 eingestellt		

HBSS+ Puffer(10 x):	NaCl	80 g
	KCl	4 g
	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	0,91 g
	KH ₂ PO ₄	0,60 g
	Dextrose	10 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2 g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,85 g
	H ₂ O	ad 1000 ml

HBSS+ Puffer (1 x):	Konzentrat (10 x)	100 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
	NaHCO ₃	0,35 g
Sterilfiltriert und auf pH 7,4 eingestellt		

Percoll 50 %:	Percoll® Konzentrat	250 ml
	HBSS+ Puffer (10 x)	50 ml
	NaHCO ₃	0,175 g
	H ₂ O	ad 500 ml
Sterilfiltriert und auf pH 7,4 eingestellt		

OP-Cocktail:	Domitor	3 ml
	Fentanyl	2 ml
	Midazolam	4 ml
	NaCl 0,9 %	1 ml

Medien für Zellkultur:

Kulturmedium für	RPMI 1640	500 ml
Kupffer-Zellen:	FCS (hitzeinaktiviert)	50 ml
	Antibiotikum (P/S/A)	5 ml

Kulturmedium für	DMEM high Glucose	500 ml
HEK 293 Zellen	FCS (hitzeinaktiviert)	50 ml
/HepG2-Zellen:	Antibiotikum (P/S/A)	5 ml
	HEPES	5 ml

Einfriermedium für	RPMI 1640	780 µl
Kupffer-Zellen:	FCS	120 µl
	DMSO	100 µl

Einfriermedium für	DMEM high Glucose	780 µl
HEK 293 Zellen:	FCS	120 µl
	DMSO	100 µl

Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Auftrennung):

TAE (50 x):	Tris/Acetat pH 8,0	2 M
	EDTA pH 8,0	50 mM

Ladebuffer:	Glycerin	5,47 ml
	Bromphenolblau	25 mg
	Xylencyanol	25 mg
	EDTA (0,5 M)	2 ml
	H ₂ O	ad 10 ml

DNA-Agarosegel:	Agarose	2 % (w/v)
	gelöst in TAE (1 x)	

Ethidiumbromidlsg.:	Ethidiumbromid in H ₂ O (10 mg/ml)	0,01 % (v/v)
---------------------	---	--------------

Sonstige Lösungen und Puffer:

Zelllyse-Puffer	Tris (1 M, pH 7,2)	5 ml
(Ripa-Puffer):	NaCl (3 M)	3 ml
	Deoxycholsäure	1 g
	Triton X 100	1 ml
	SDS (20 %)	500 µl
	H ₂ O	ad 100 ml

Waschpuffer für	Tris (0,5 M, pH 6,8)	20 ml
Western Blot:	NaCl (5 M)	20 ml
	Tween 20	1 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml

Cäsiumchloridlsg.	CsCl ₂	11,2 g
„light stock“ mit	VSB (1 x)	ad 50 g
1,2 g/ml:		

Cäsiumchloridlsg. „heavy stock“ mit 1,46 g/ml:	CsCl ₂ VSB (1 x)	21,1 g ad 50 g
--	--------------------------------	-------------------

VSB (10 x):	NaCl KCl Tris (1M, pH 7,4) MgCl ₂ x 6 H ₂ O H ₂ O auf pH 7,4 eingestellt	80 g 3,72 g 100 ml 2 g ad 1000 ml
-------------	--	---

TBS-BG:	Tris/HCl (pH 7,6) NaCl (1 M) KCl (100 mM) MgCl ₂ x 6 H ₂ O (150 mM) Glycin BSA H ₂ O auf pH 7,6 eingestellt Tween 20 Na-Azid	200 mM 137 ml 30 ml 10 ml 5 g 5 g ad 1000 ml
---------	--	--

Adenovirus (Ad)- Infektions-Medium:	PBS (1 x) CaCl ₂ (20 mM) MgCl ₂ (20 mM) FCS Pen./Strept.	250 ml 2,5 ml 2,5 ml 5 ml 2,5 ml
--	--	--

4.2 Methoden

4.2.1 Tierhaltung und humanes Lebermaterial

Männlichen Ratten des Typs Sprague Dawley (Charles River, Sulzfeld) mit einem Liefergewicht von 200-220 g wurden bei konstanten Temperaturverhältnissen von 21 °C in einem 12-stündigen Tages- und Nachtrhythmus bei freiem Zugang zu Nahrung und Wasser für mindestens eine Woche vor Experimentstart im Tierstall der Forschungslaboratorien des Klinikums der Universität Regensburg gehalten. Alle Tierexperimente wurden gemäß den Vorschriften der Deutschen Gesellschaft für Physiologie für die Haltung und Gebrauch von Labortieren durchgeführt.

Gewebeproben von humanen Leberresektaten wurden von Patienten erhalten, die wegen Lebermetastasen verschiedenen Ursprungs partiell hepatektomiert wurden bzw. die aufgrund einer Leberzirrhose eine Transplantatleber erhielten. Die Gewinnung des humanen Lebergewebes erfolgte nach den Richtlinien der lokalen Ethik-Kommission (Universitätsklinikum Regensburg, Deutschland) sowie der ausdrücklichen Zustimmung der Patienten. Nur Lebergewebe, welches mikroskopisch durch 2 Pathologen als nicht tumorartig beurteilt wurde, wurde zur weiterführenden Zellisolation verwendet.

4.2.2 Isolation von Kupffer-Zellen aus Ratten-Lebern bzw. aus humanem Lebergewebe

Die verwendete Isolationsmethode ist geeignet, um reine Populationen von parenchymalen Zellen (PCs) und nicht parenchymalen Zellen (NPCs, u.a. Kupffer-Zellen), zu generieren und für weitere Untersuchungen zur Verfügung zu stellen. Die beschriebene Technik stellt eine einfache und schnelle Methode dar, die sich speziell auf die Gewinnung von KCs fokussiert. Ziel der Methode ist eine große Anzahl an reinen, überlebensfähigen und funktionell intakten Zellen zu erhalten, ohne dabei die physiologischen Eigenschaften der Zellen maßgeblich zu verändern oder Komponenten der Zytoplasmamembran zu beschädigen. Das beschriebene Protokoll nach Smedsrød und Pertoft (111) wurde als Grundlage verwendet und entsprechend optimiert (112). Es basiert auf der Kollagenase-Perfusion der Leber, isopyknischer Sedimentation in Percoll® und selektiver Adhäsion der Zellen in Kultur. Das Protokoll ist in

5 Abschnitte unterteilt (Tierpräparation, Operation, Leberperfusion, Zentrifugation, Zellzählung und Kultur).

Sämtliche Lösungen und Materialien für die Isolation waren steril und aseptische Techniken wurden verwendet.

Abschnitt 1: Tierpräparation

Die Tiere wurden zunächst gewogen und durch eine intramuskuläre Injektion eines „OP-Cocktails“ (2 µl/g Körpergewicht, Zusammensetzung: Domitor 3 ml, Fentanyl 2 ml, Midazolam 4 ml, NaCl 0,9 % 1 ml) narkotisiert. Es erfolgte eine komplette Rasur des Bauchraums und des unteren Thorax der Ratten. Anschließend wurden die Tiere am Arbeitsplatz fixiert (Abb. 7).

Abschnitt 2: Operation

Nach der Fixation wurden die Tiere durch einen 1-2 cm langen medialen Schnitt, einen vertikalen Schnitt bis zum Sternum und horizontalen Schnitten an beiden Seiten bis zum Rippenbogen laparatomiert. Danach wurde ein steriler Faden unter die Vena Cava inferior (IVC) und die Portalvene eingeführt, wobei diese jeweils lose abgebunden wurden. Weiterhin wurde ein 20 G Katheter in die Portalvene eingeführt und mit Hilfe des Fadens fest fixiert. Ein luftblasenfreier Schlauch mit der Perfusionslösung (HBSS-, 37°C) wurde mit dem Katheter verbunden (Abb. 7).

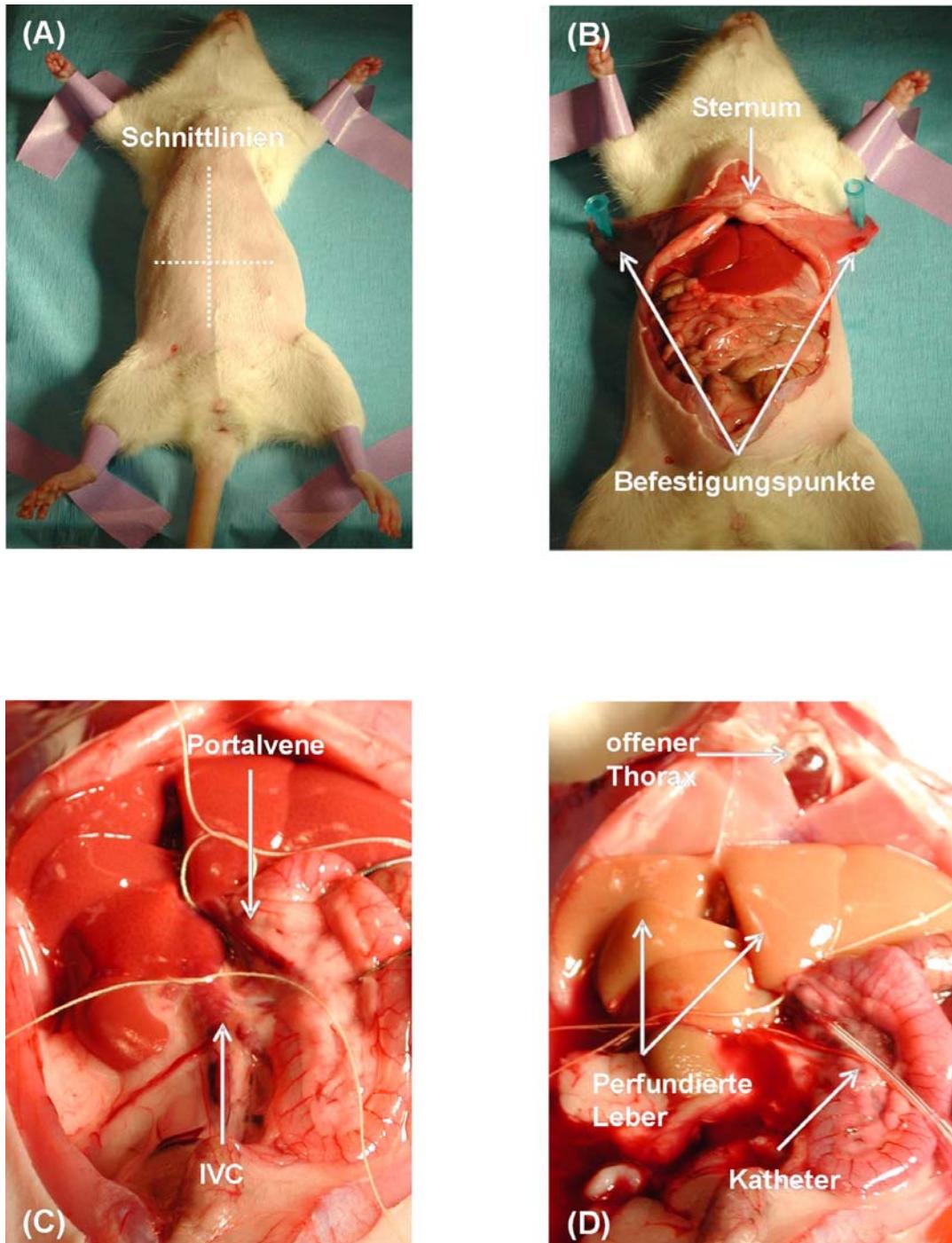


Abb. 7: Isolation von Kupffer-Zellen aus Ratten-Lebern. Die Abbildungen A-D zeigen die einzelnen Abschnitte bei der Tierpräparation, Operation und Leberperfusion. **(A)** Fixation des Tieres am Arbeitsplatz. Die empfohlenen Schnittlinien für die Öffnung des Abdomens sind dargestellt. **(B)** Geöffneter Abdomen nach dem medialen und horizontalen Schnitt. **(C)** Einführen eines sterilen Fadens unter die Portalvene und die untere Vena Cava inferior (IVC) und loses Abbinden des Fadens. **(D)** Geöffneter Thorax und perfundierte Leber nach dem Durchtrennen der IVC und der Baucharterie. Dabei wird der Katheter in die Portalvene gelegt und mit dem Faden fixiert.

Abschnitt 3: Leberperfusion

Sowohl die Vena Cava inferior (am distalen Teil unterhalb der Ligation) als auch die Baucharterie wurden durchtrennt, um restliches Blut aus dem Gefäßsystem zu entfernen. Weiterhin wurde der Thorax geöffnet und das Herz durchschnitten. Der Faden an der Vena Cava inferior unterhalb der Leber wurde fest abgebunden und die Leber wurde für 10 min mit HBSS- Puffer perfundiert (Perfusionsrate 20 ml/min). Nach 10 min wurde die Perfusionslösung durch HBSS+ Puffer gewechselt, welcher 0,02 % Kollagenase Typ IV enthielt, und die Perfusion für weitere 10 min fortgesetzt. Beim Wechsel der Perfusionsflüssigkeit wurde darauf geachtet, dass keine Luft in das Perfusionssystem gelangen konnte. Durch den Enzymverdau wurden Zellen erhalten, welche frei von Desmosomen und Tight Junctions sind. Nach der Perfusion wurde die Leber entnommen und vorsichtig mit PBS 1 x gespült, um restliches Blut an der Außenseite zu entfernen. Die Leber wurde in einen sterilen Becher überführt und mit etwa 50 ml HBSS+ bedeckt. Danach wurde das Leberhomogenat vorsichtig mit Pinzetten zu einer Suspension zerkleinert. Die Zellsuspension wurde durch einen sterilen, engmaschigen Filter (Porengröße 50 µm) filtriert, um unverdautes Gewebe und Bindegewebe zu entfernen, und in ein 50 ml Falcon überführt.

Abschnitt 4: Zentrifugationsschritte

Alle Schritte zwischen den Zentrifugationen wurden in 50 ml Falcons auf Eis ausgeführt.

Die Zellsuspension wurde bei 70 g, 4 °C und maximaler Bremse zentrifugiert. Im somit gewonnenen Überstand befindet sich hauptsächlich die nicht parenchymatische Leberzellfraktion (Kupffer-Zellen, Ito-Zellen, Endothelzellen). Das Zellpellet enthält parenchymatische Zellen (Hepatozyten), die mit entsprechenden Proteinen weiter aufgereinigt werden können. Das Zellpellet wurde mit 50 ml HBSS+ resuspendiert und die Suspension erneut bei 70 g, 4 °C und maximaler Bremse zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet dann verworfen. Die beiden Überstände wurden anschließend mit HBSS+ auf 50 ml aufgefüllt und die Falcons bei 650 g, 4 °C und maximaler Bremse zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet bein-

haltet nun hauptsächlich Kupffer- und Ito-Zellen und einige parenchymatische Zellen, Erythrozyten und Zelldebris. Die Überstände der Zentrifugation wurden verworfen und die Pellets mit 10 ml HBSS+ pro Falcon resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde vorsichtig auf einen 50%/25% 2-Schicht-Percoll®-Gradienten in einem 50 ml Falcon überschichtet. Dabei sollte vermieden werden, dass sich die Zellsuspension mit der oberen Percollschicht vermischt. Die Falcons wurden bei 1800 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert (keine Bremse). Die Zellen wurden im Gradienten in 4 verschiedene Zonen aufgeteilt. Die obere Schicht, welche nicht in die obere Percollbande eindrang, beinhaltet hauptsächlich Debris, beschädigte Zellen und wenige intakte NPCs. Die beiden mittleren Fraktionen bestehen hauptsächlich aus gereinigten NPCs, das Pellet aus Erythrozyten, NPCs und PCs (Abb. 8). Nach der Zentrifugation wurde die obere Schicht eines jeden Falcons entfernt und verworfen. Die beiden mittleren Schichten der Falcons wurden vereinigt und mit HBSS+ auf 50 ml aufgefüllt. Es erfolgte eine Zentrifugation der gepoolten Schichten bei 650 g und 4 °C für 7 min (maximale Bremse). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml HBSS+ vorsichtig resuspendiert.

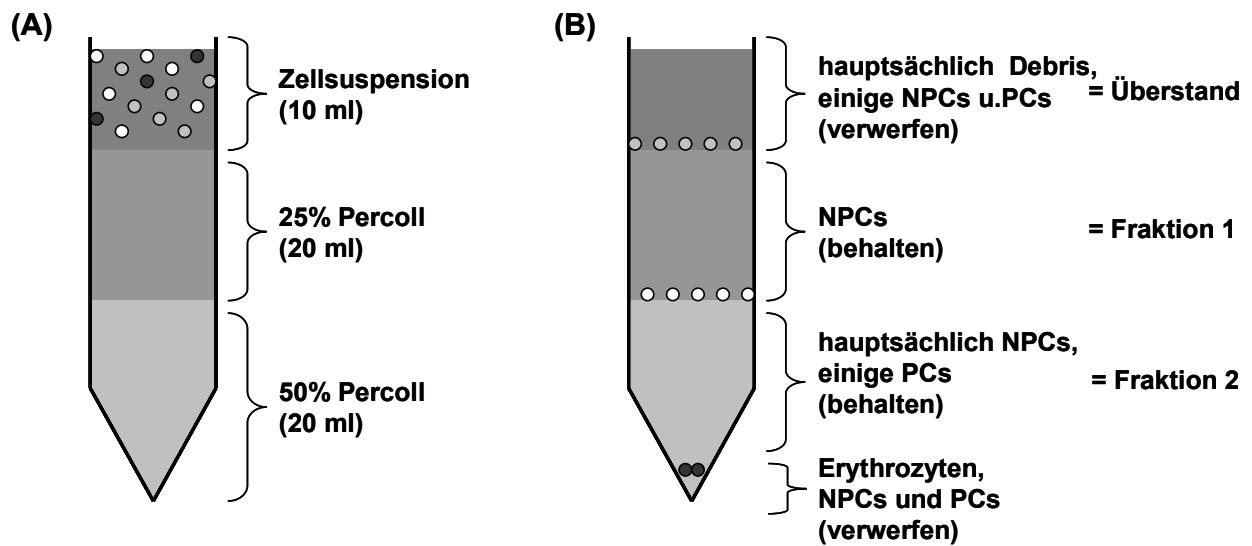


Abb. 8: Isopyknische Gradienten-Zentrifugation des gewonnenen Leberhomogenats mit Percoll®. (A) Die Zellsuspension, welche hauptsächlich die nicht parenchymatische Zellfraktion beinhaltet, wird vor der Zentrifugation auf einen 50 %/ 25% 2-Schicht Percoll®-Gradienten überschichtet. (B) Nach der Zentrifugation werden die Zellen in 4 Fraktionen aufgetrennt. Fraktion 1 beinhaltet hierbei die höchste Konzentration an KCs.

Abschnitt 5/1: Zellzahlbestimmung und Vitalitätsprüfung

Die Zellzahl und die Vitalität der Zellen wurden bestimmt, indem die Zellsuspension mit Trypanblaulösung 1:2 verdünnt wurde. Tote Zellen wurden mit Trypanblau dunkel angefärbt und konnten somit im Mikroskop deutlich von intakten Zellen unterschieden werden. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurden die lebenden Zellen innerhalb eines Großquadrats (16 Kleinquadrate) ausgezählt (Abb. 9).

$$\text{Berechnung der Zellzahl: } Z \text{ [Zellen/ml]} = Z \times V \times 10^4$$

Z = Zahl der ungefärbten Zellen in einem Großquadrat (1 mm^2)

V = Verdünnungsfaktor

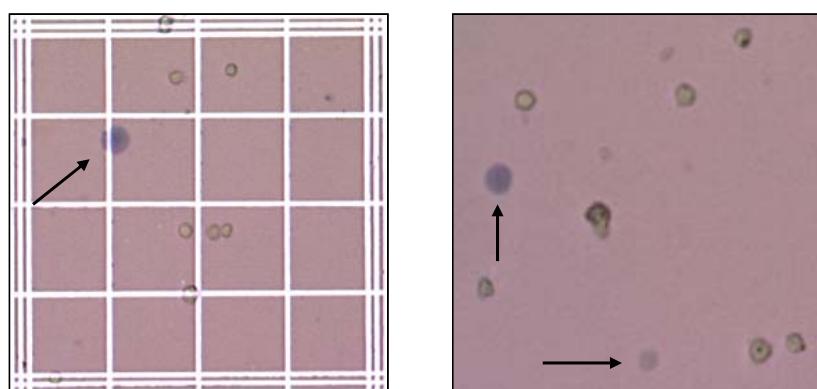


Abb: 9: Zählung intakter KCs nach Isolation mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Die Pfeile im rechten und linken Bild zeigen nicht intakte, ausgeschlossene Zellen an.

Abschnitt 5/2: Zellkultur

Die isolierten KCs wurden mit der geforderten Dichte ($0,5-50 \times 10^6$) im Kulturmedium auf Zellkulturplatten oder Petripermsschalen (für Experimente zur Bestimmung der Zellzahl) ausgesät. Nach 15-20 min erfolgte ein Wechsel des Überstandes, um nicht adhärente Zellen zu entfernen. KCs adhärieren schneller an Plastik, weshalb verbliebene Hepatozyten, Ito-Zellen und Endothelzellen effizient entfernt werden können. Die KC-Populationen wurden über einen angemessenen Zeitraum (gewöhnlich $\geq 24 \text{ h}$) vor dem Start der Experimente kultiviert.

Die Isolation von humanen KCs erfolgte prinzipiell nach der gleichen Methode (113). Der Überstand mit den NPCs wurde von PD. Dr. Thomas Weis am Zentrum für Leberzellforschung des Klinikums der Universität Regensburg generiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Isolation der humanen KCs wurde dann in analoger Weise wie die Isolation der Ratten-KCs nach dem Abtrennen der Hepatozytenfraktion weitergeführt.

4.2.3 Magnetische Zellsortierung von Ratten-Kupffer-Zellen (MACS)

Zur Bestimmung der KC-Population in der Durchflusszytometrie wurden die Makrophagen mit Hilfe von magnetischen MicroBeads und des autoMACS™ Separators weiter aufgereinigt.

10 x 10⁶ KCs wurden dabei zur Blockierung unspezifischer Bindestellen in 100 µl Kulturmedium aufgenommen und mit 10 µl Maus IgG1 für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS 1 x zweimal gewaschen und anschließend für 45 min mit einem für Ratten-Makrophagen spezifischen ED2-Antikörper (CD 163, Oberflächenmarker für KCs, 10 µg/ml) bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS 1 x gewaschen und in 100 µl Kulturmedium resuspendiert. Durch Zugabe von 20 µl Goat Anti-Mouse IgG MicroBeads und Inkubation für weitere 45 min erfolgte die indirekte magnetische Markierung der Makrophagenpopulation. Nach 2 erneuten Waschschritten zur Entfernung nicht gebundener Beads, wurden die Zellen in 8 ml PBS 1 x resuspendiert und mit dem autoMACS™ Separator (Programm Possel-d) weiter aufgereinigt. Durch diesen automatischen Zellsorter können Zellen bis zu 10000-fach angereichert (Positivselektion) oder „ungewünschte“ Zellen (Negativselektion) bis zu 99 % entfernt werden. Das Prinzip ist hierbei, dass markierte KCs durch ein magnetisches Feld weiter angereichert und so von unmarkierten Zellen, wie beispielweise Hepatozyten oder Ito-Zellen (Negativ-Eluat), abgetrennt werden. Nach dem Abschalten des Magnetfeldes wurde eine äußerst reine Zellpopulation erhalten, indem die so aufgereinigten Zellen (Positiv-Eluat) von der Säule eluiert wurden.

4.2.4 Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence activated cell sorting)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine mehrparametrische Analyse von Zellen. Durch Detektion des Streulichtverhaltens und der Fluoreszenz von Einzelzellen, die über spezifische Rezeptoren, Proteine (membranständig oder intrazellulär) oder Latex-Beads fluoreszenzmarkiert wurden, können chemische und physikalische Eigenschaften der Zellen erfasst werden. Die Methode ermöglicht die Analyse von hohen Zellzahlen innerhalb kurzer Zeit (bis zu 1000 Zellen/sec). Beim verwendeten Durchflusszytometer Coulter®EPICS®XL-MCL™ werden die Zellen in einer Suspension vorgelegt. In einem Flüssigkeitsstrom werden die einzelnen Zellen durch eine Messküvette geschleust, auf die ein Laserstrahl mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Argonlaser) trifft. Gestreutes Licht und Fluoreszenz werden zu Photomultipliern (PMT) geleitet und detektiert. Abb. 10 zeigt den schematischen Aufbau des optischen Systems des Durchflusszytometers Coulter®EPICS®XL-MCL™. Die Photodiode für Vorwärtsstreulicht (FS) detektiert Licht, das in Strahlenrichtung von der Zelle gestreut wird. Die Intensität des Vorwärtsstreulichtes gibt Auskunft über die Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SS) wird orthogonal zum Strahlengang detektiert. Das SS-Signal ist abhängig von der inneren Struktur der Zelle und liefert ein Maß für die Granularität der Zelle. Die Fluoreszenzemission bei Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen (Fluoresceinisothiocyanat [FITC], R-Phycoerythrin [PE], Energy-coupled dye [ECD] und R-Phycoerythrin-Cyanin 5 [PC5]) wird wie das Seitenstreulicht im 90°-Winkel zur Strahlenrichtung des Lasers gesammelt und nach Abtrennung mit Hilfe von dichroitischen Spiegeln und Interferenzfiltern in Spektralbereiche bestimmter Wellenlängen aufgetrennt.

Fluorochrom	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)	Fluoreszenz
FITC	495	525	Grün
PE	488	575	Orange-rot
ECD	488	625	Rot
PC5	488	670	Tief-rot

Tab. 4: Fluoreszenzfarbstoffe bei FACS-Färbungen mit deren Absorptions- und Emissionsmaxima.

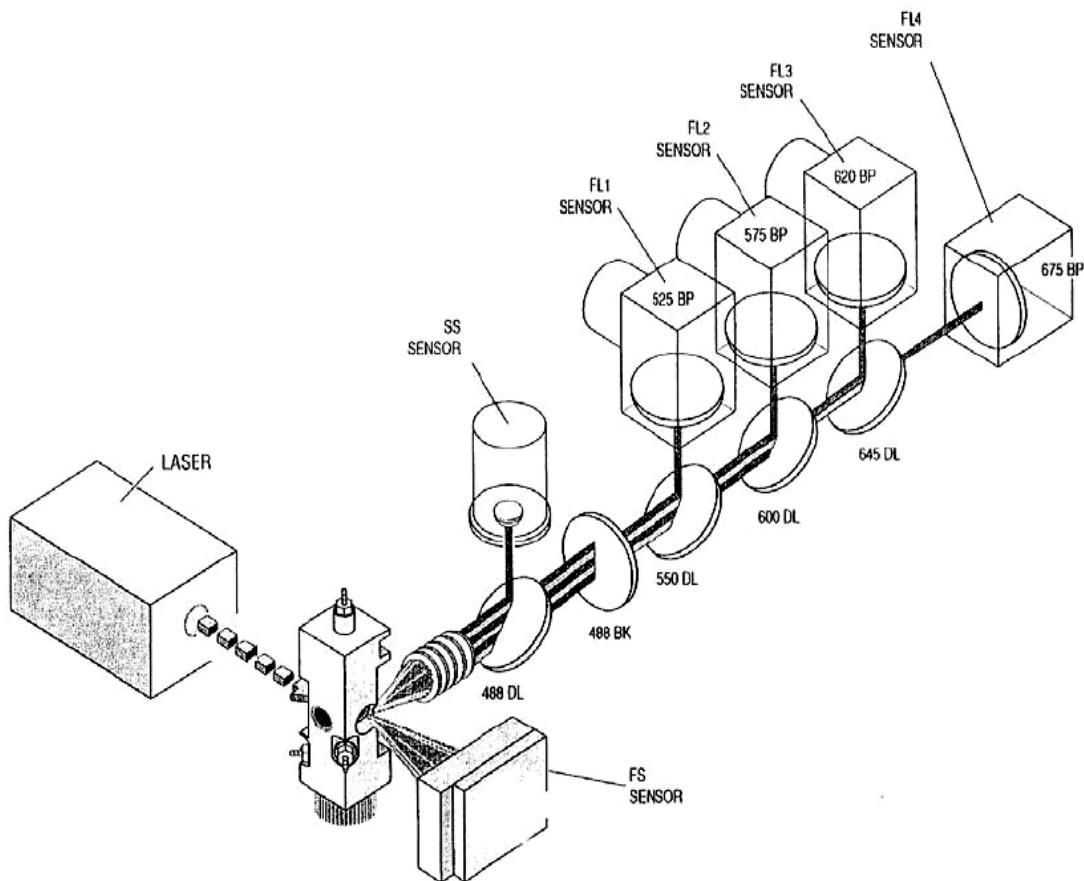


Abb. 10: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie. Schematische Darstellung anhand des Durchflusszytometers Coulter®EPICS®XL-MCL™ in Anlehnung an das „user manual“ von Coulter, Immunotech. Vorwärtsstreulicht (FS), Seitwärtsstreulicht (SS), dichroitischer Spiegel (DL), Filter (BK) und Sensormessbereich in nm (BP).

Verwendet man mehrere Fluoreszenzfarbstoffe, die sich in ihrem Emissionswellenbereich überlagern, so muss die spektrale Überlappung ausgeglichen werden, um in einem Kanal nur die gewünschte Fluoreszenz zu detektieren. Hierzu verfügt das Durchflusszytometer über ein elektronisches Kompensationswerk.

Für jede vermessene Zelle wird eine Datenbank angelegt. Dadurch ist es möglich, Zellsubpopulationen einer Messung unabhängig voneinander zu betrachten und zu analysieren. Zellpopulationen können im Histogramm oder, bei Auftragung von 2 gemessenen Parametern, als Dot Plot dargestellt werden. Sämtliche Messungen wurden mit der Expo 32 ABC Analysis Software ausgewertet.

In dieser Arbeit wurde eine durchflusszytometrische Analyse der magnetisch isolierten Makrophagen durchgeführt, um deren Reinheit zu bestimmen und die Oberfläche der Zellen auf mögliche Isolationsschäden zu untersuchen. Hierfür erfolgte zunächst ein Blockierschritt mit einer 1:500-Verdünnung von FCS in PBS 1 x (30 min auf Eis).

Die Makrophagenpopulation wurde anschließend durch Inkubation mit jeweils 10 µg/ml Antikörper (CD 68 FITC-Färbung für Ratten-KCs und CD 33 PE-Färbung für humane KCs) für 30 min auf Eis markiert. Entsprechende Isotyp-Kontrollen wurden jeweils mitgeführt.

Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in PBS 1 x resuspendiert und entweder sofort gemessen oder sie wurden in einer 2-%igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert und zu einem späteren Zeitpunkt gemessen. Des Weiteren erfolgte eine durchflusszytometrische Untersuchung der Phagozytoseaktivität von humanen und Ratten-KCs (siehe 4.2.6.2).

4.2.5 Einfrieren und Auftauen von Kupffer-Zellen

10×10^6 KCs wurden nach Isolation in 1 ml Einfriermedium suspendiert und unter aseptischen Bedingungen in Kryoröhrchen überführt. Die Zeitperiode zwischen dem Beginn des Einfriervorgangs und der Zugabe von DMSO betrug 10 min (eqillibration time = Stufe I). Anschließend wurden die Proben in das Einfriergerät Nicool LM 10 gestellt, welches einen sehr schonenden Einfriervorgang über mehrere Stufen ermöglicht (Stufe II bis IV: Abkühlraten zwischen -0,1 bis -2,5 °C/min, Abb. 11). Danach wurden die Kryoröhrchen in einem flüssigen Stickstoffbehälter überführt, wo die dauerhafte Lagerung bei -178 °C erfolgte.

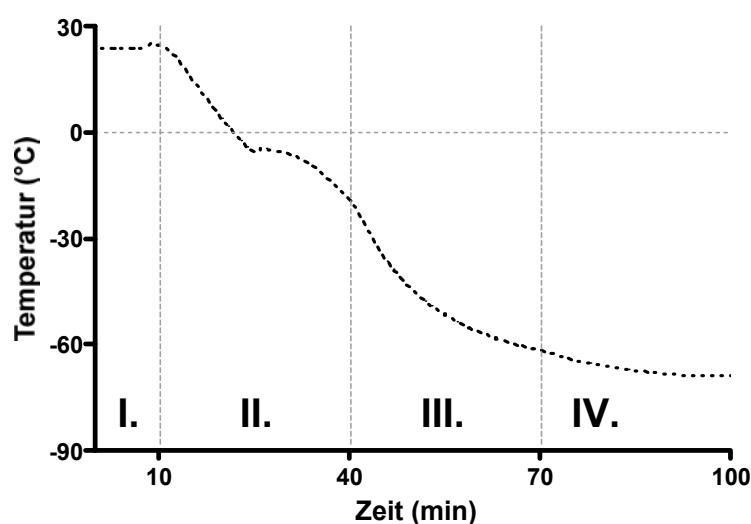


Abb. 11: Kryokonservierung von KCs. Schematische Darstellung des kontrollierten Einfriervorganges von KCs über 4 Schritte mit dem Nicool LM 10 Einfriergerät. Der Temperaturverlauf wurde mit Hilfe einer digitalen Thermosonde bestimmt.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus der Lagerung in flüssigem Stickstoff genommen und in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt, schnell aufgetaut, anschließend in 10 Volumenteilen vorgewärmten Kulturmedium gewaschen (650 g, 7 min, 4 °C) und mit frischem Medium wieder in Kultur genommen.

4.2.6 Phagozytoseaktivitätsassay

4.2.6.1 Präparation und Phagozytose von fluoreszierenden Latex-Beads

Zur Opsonierung (Anlagerung von Plasmabestandteilen an Oberflächen bzw. Antigenen) wurden die verwendeten fluoreszierenden Polystyrol Microspheres auf eine Dichte von 5×10^5 Partikel/ μ l eingestellt und mit FCS, welches mit PBS 1 x auf 50 % verdünnt wurde, 1 h bei 37 °C inkubiert.

Für die Bestimmung der Phagozytoseaktivität wurden die KCs auf 60 x 15 mm Dishes (2 Millionen Zellen/Dish) ausgesät, das Medium nach 30 min ersetzt und die opsonierten FITC-markierten Latex-Beads im Verhältnis 40:1 zu dem Kulturmedium gegeben. Als Kontrolle wurden KCs analog behandelt, ohne dabei das Medium mit den Latex-Beads zu versetzen. Nach 24 h Inkubation (37 °C, 10 % CO₂) wurde das Medium entfernt und die adhärenten Zellen zweimal mit eiskaltem PBS 1 x gewaschen, um nicht aufgenommene Beads zu entfernen. Die Phagozytoseaktivität wurde durch Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert und entsprechende Bilder mit Hilfe eines Zeiss Axiovert 25 Phasenkontrastmikroskopes generiert. Für anschließende FACS-Analysen wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Plattenboden abgekratzt, in 1 ml eiskaltem PBS 1 x aufgenommen und resuspendiert.

4.2.6.2 Quantitative Auswertung der Phagozytose von FITC-markierten Latex-Beads durch FACS-Analysen

Die quantitative Messung der Phagozytoseaktivität wurde mit dem beschriebenen FACS-Gerät Coulter®EPICS®XL-MCL™ durchgeführt. Die Datenauswertung von jeweils 10000 Ereignissen erfolgte mit Hilfe der Expo 32 ABC Analysis Software. Der Prozentsatz an phagozytierenden Zellen wurde bestimmt als die Anzahl an geshifteten Ereignissen in Region A (entsprechend Gate B) bezogen auf alle Ereignisse. Die geometrische mittlere Fluoreszenzintensität von Region A wurde definiert als die

Anzahl an Beads, die pro Zelle aufgenommen wurden (Abb. 12). Bei der Berechnung des Prozentsatzes an phagozytierenden Zellen bzw. der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensität wurde jeweils die Hintergrundfluoreszenz der Kontrollgruppe abgezogen.

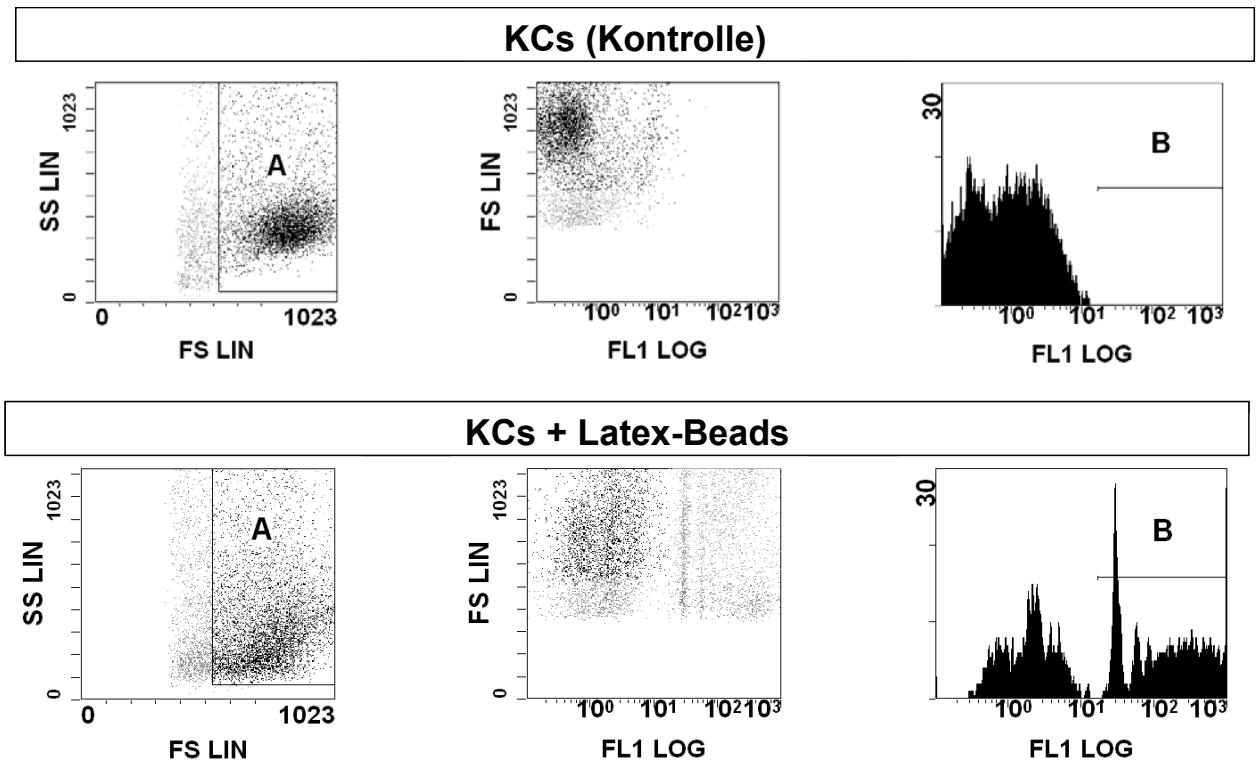


Abb. 12: FACS-Analyse von adhärenen KCs nach Phagozytose von Latex-Beads. Gezeigt sind repräsentative Dot Plot-Darstellungen von Forward Scatter- (FS-) gegen Sideward Scatter- (SS)-, Forward Scatter gegen Fluoreszenzintensitäts-Messungen und ein typisches Histogramm von sowohl Kontroll-KCs als auch KCs, die für 24 h die Beads phagozytiert haben. Zellen, die keine Beads aufgenommen haben, hatten nur geringe Fluoreszenzintensitäten, während Zellen, die ein oder mehrere Beads inkoperiert haben, progressiv zu höheren Fluoreszenzregionen shifteten.

4.2.7 Virale Methoden

4.2.7.1 Kultur von HEK 293 Zellen

Zur Vermehrung von vermehrungsdefizienten EA1-deletierten Adenoviren wurde die adhärerente, embryonale Nierenzelllinie HEK 293 (Clontech) eingesetzt, da sie deren Genom mit den EA1-Produkten komplettiert. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage bei einer Konfluenz von 90 % je nach Bedarf in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 gespli-

tet. Dazu wurden die HEK 293 Zellen mit 1 x Trypsin/EDTA in PBS 1 x abgelöst, mit Medium versetzt, zentrifugiert und in neuen T175 Kulturflaschen mit dem Kulturmedium kultiviert. Zur Lagerung von Zellaliquots wurden diese mit Einfriermedium bestehend aus 78 % (v/v) DMEM, 12 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS und 10 % (v/v) DMSO versetzt, mit dem beschriebenen Einfriergerät Nicool LM 10 in Analogie zu den KCs (siehe 4.2.5) eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.2.7.2 Vermehrung von Adenoviren

Die Vermehrung der Virusstocks (Ad5.EGFP, Ad5.hIL 10) erfolgte in HEK 293 Zellen. In einer T175 Zellkulturflasche wurden ca. 1,5 bis 2×10^7 der adhärenten HEK 293 Zellen ausgesät und am folgenden Tag das Medium gewechselt, um nicht adhäsente Zellen zu entfernen. Am Tag 2 nach der Aussaat hatten die Zellen eine Konfluenz von 80-90 % erreicht. Für die Infektion der HEK 293 Zellen wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen und diese dann mit PBS 1 x mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer möglichst geringen Menge an Medium (10 ml/Flasche) bedeckt, in dem sich die Virussuspension befand. Zur Vermehrung wurde eine MOI (multiplicity of infection) von 5-10 eingesetzt. Die Zellen wurden täglich beobachtet, um den optimalen Zeitpunkt der Ernte zu ermitteln. Lösten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche ab oder zeigte ein Großteil der adhärenten Zellen eine kugelige Morphologie als Korrelat des zytopathischen Effekts (Dauer ca. 3-4 Tage nach Beginn der Infektion), wurden die Zellen mechanisch vollständig abgelöst. Die erhaltene Zellsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.2.7.3 Dichtegradienten-Zentrifugation zur Anreicherung der Adenoviren

Die mit Adenovirus infizierten HEK 293 Zellen wurden durch schnelles Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C im Wasserbad aufgeschlossen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die Suspension mit dem Zelldbris und den freigesetzten Adenoviren wurde anschließend bei 800 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und der virushaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Überstände wurden entweder direkt verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei

-20 °C gelagert. Die weitere Anreicherung der Adenoviren wurde mittels eines Cäsiumchloridgradienten durchgeführt. Dazu wurden 2 Cäsiumchloridlösungen unterschiedlicher Dichte verwendet. Zunächst wurde in einem Polyallomer Röhrchen 3,5 ml CsCl-Lösung (Dichte 1,2 g/ml) vorgelegt und diese dann mit 3,5 ml CsCl (Dichte 1,46 g/ml) unterschichtet. Auf diesen Gradienten wurde ca. 3 ml Überstand der aufgeschlossenen Zellen gegeben und in einer Ultrazentrifuge mit einem SW 41 TI Rotor mit 30.000 rpm für 15 h bei 10 °C zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde mit Hilfe einer Punktionskanüle (G 22) und einer 1 ml Einwegspritze die virusenthaltende Bande aus dem Gradienten gewonnen. Die stark CsCl-haltige Virussuspension wurde in eine Dialysekassette (MW 10.000) eingebracht und unter ständigem Rühren bei 4 °C in VSB 1 x dialysiert. Der VSB 1 x wurde nach 3 h erneuert und die Dialysekassette über Nacht in diesem Puffer belassen. Am nächsten Tag wurde die entsalzte Viruslösung aus der Dialysekassette gewonnen und 1:1 mit dem Lagerungspuffer für Adenoviren versetzt. Diese Virusstammlösung wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert (114).

Das Konzentrieren der Adenoviren nach der Vermehrung war prinzipiell notwendig, da für eine effiziente Transduktion von KCs erhöhte MOIs erforderlich sind (115).

4.2.7.4 Virustiterbestimmung

Die Bestimmung der Virustiter erfolgte in Zusammenarbeit mit PD. Dr. Thomas Dobner (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg).

Zur Bestimmung der Virustiter wurden 1×10^6 HEK 293 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 10 % CO₂ wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS 1 x (auf 37 °C vorgewärmt) gewaschen. Das PBS 1 x wurde abgenommen und die Virusverdünnungen im Bereich von 10^{-3} bis 10^{-5} im Infektionsmedium auf die Zellen gegeben. Nach einstündiger Inkubation wurden die Verdünnungen entfernt und das Kulturmedium wurde zugesetzt. 24 h nach Infektion wurde das Medium abgezogen, die Zellen mit PBS 1 x gewaschen und mit eiskaltem Methanol für 15 min fixiert. Nach zweimaligem Waschen in TBS-BG erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:10 in TBS) über Nacht bei 4 °C. Nach dem Entfernen des Antikörpers und dreimaligem Waschen mit TBS-BG wurde der FITC-markierte Sekundärantikörper zugegeben (Verdünnung 1:1000). Die Zellen wurden für 3 h mit dem Antikörper inkubiert, danach dreimal mit TBS-BG gewaschen

und zur Bestimmung der infizierten Zellen erfolgte die Zugabe von 1 ml neuem TBS-BG. In der Folge wurde der Virustiter (fluorescence forming units/ml) mikroskopisch bestimmt, indem die leuchtenden Zellen von 10 verschiedenen Gesichtsfeldern pro Well ausgezählt wurden. Die Berechnung erfolgte nach der Formel (32 x Objektiv):

$$\text{Virustiter (ffu/ml)} = \text{MW d. leuchtenden Zellen} \times 3207 \times \text{Verdünnung d. Viruses}$$

4.2.8 Tierversuche

4.2.8.1 Repopulation von Karbon-markierten Kupffer-Zellen

Karbon-Partikel (57 mg/kg Körpergewicht) wurden über die Schwanzvene in männliche Sprague Dawley-Ratten (250-300 g) injiziert. Die Isolation der KCs wurde 24 h nach der Karboninjektion durch Kollagenaseverdau der Spenderleber durchgeführt. 30×10^6 isolierte KCs wurden intravenös in die mit Cyclosporin A (10 mg/kg Körpergewicht, i.p.) und/oder Gadoliniumchlorid (10 mg/kg Körpergewicht, i.p.) vorbehandelte Empfängertiere gespritzt. Die Isolation der Empfängerlebergewebe erfolgte 24 h nach der Transplantation der Zellen. Die Gewebe wurden mit Methylgrün gefärbt und die Neuansiedlung der Karbon-markierten KCs wurde durch Lichtmikroskopie quantitativ ausgewertet. Zur Quantifizierung wurden mindestens 4 unterschiedliche Leberregionen mit 5 Gesichtsfeldern ausgezählt und die jeweiligen Mittelwerte gebildet. Als Negativkontrolle dienten NaCl-injizierte Tiere. Den Positiv-Kontrolltieren injizierte man eine Karbon-Suspension (57 mg/kg Körpergewicht) (Abb.13).

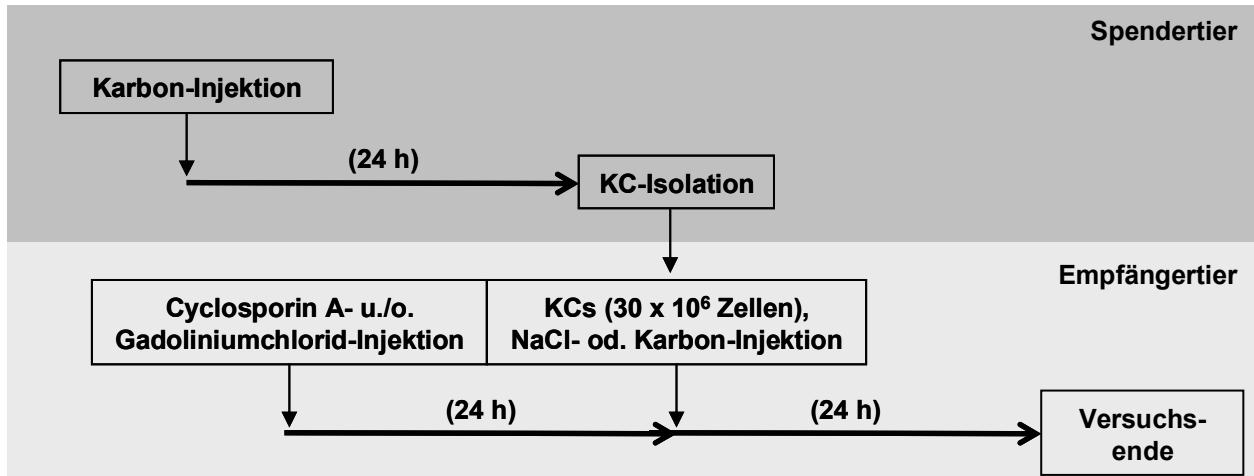


Abb. 13: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Repopulation Karbon-markierter Kupffer-Zellen in Ratten-Lebern.

4.2.8.2 Repopulation von adenoviral transduzierten Kupffer-Zellen

Männlichen Sprague Dawley-Ratten (250-300 g) wurden 3×10^9 ffu (mit 0,9-%iger NaCl-Lösung auf 500 µl verdünnt) Ad5.EGFP- oder Ad5.hIL 10-Viruspartikeln bzw. 500 µl einer 0,9%-igen NaCl-Lösung in die Schwanzvene injiziert. Nach 48 h wurden die adenoviral transduzierten bzw. die Kontroll-KCs isoliert und jeweils 30×10^6 Zellen intravenös in die Empfängertiere gespritzt, die 24 h vorher eine einmalige Gabe des Immunsuppressivums Cyclosporin A (10 mg/kg Körpergewicht, i.p.) erhielten. Nach weiteren 24 h wurden die Empfängertiere getötet und Leber, Lunge und Milz für weiterführende Untersuchungen entnommen. Die Positiv- bzw. Negativ-Kontrollen umfassten Tiere, denen einer der Virusstocks (Ad5.EGFP, Ad5.hIL 10; je 3×10^9 ffu/Tier) bzw. eine 0,9-%ige NaCl-Lösung gespritzt wurde und nach 48 h anstatt den KCs eine Trägerlösung injiziert wurde (Abb. 14).

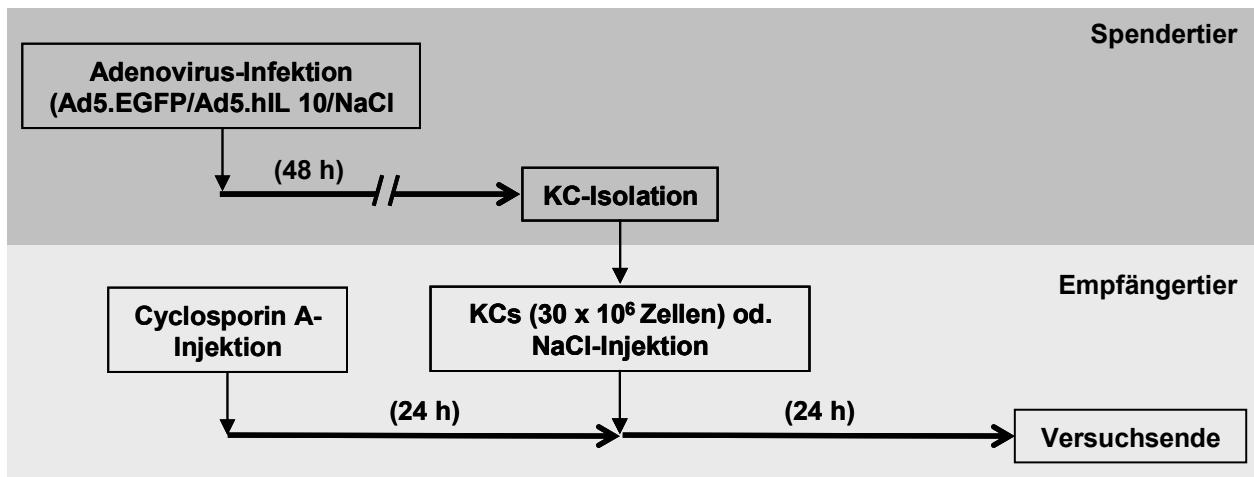


Abb. 14: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Repopulation adenoviral transduzierter Kupffer-Zellen in Ratten-Lebern.

4.2.8.3 Repopulation von adenoviral transduzierten Kupffer-Zellen in einem akuten Schädigungsmodell der Leber (Ischämie-/Reperfusionsmodell)

Männlichen Sprague Dawley-Ratten (250-300 g) wurden 3×10^9 ffu (mit 0,9-%iger NaCl-Lösung auf 500 µl verdünnt) Ad5.EGFP- bzw. Ad5.hIL 10-Viruspartikeln in die Schwanzvene injiziert. Als Kontrolle dienten Tiere, denen 500 µl einer 0,9-%igen NaCl-Lösung injiziert wurde. Nach 48 h wurden die adenoviral transduzierten bzw. die Kontroll-KCs isoliert und jeweils 30×10^6 Zellen intravenös in die Empfängertiere gespritzt, die 24 h vorher eine einmalige Gabe des Immunsuppressivums Cyclosporin A (10 mg/kg Körpergewicht, i.p.) erhielten. Die Positiv- bzw. Negativ-Kontrollen umfassten Tiere, denen einer der Virusstocks (Ad5.EGFP, Ad5.hIL 10; je 3×10^9 ffu/Tier) bzw. eine 0,9-%ige NaCl-Lösung gespritzt wurde und nach 48 h anstatt den KCs eine Trägerlösung injiziert wurde. Nach weiteren 24 h erfolgte bei den Empfängertieren und Kontrollen (jeweils über Nacht nüchtern gehalten) die Ischämie-/Reperfusions-Operation (bzw. Sham-OP als Kontrolle). Hierfür wurden die Tiere zunächst mit einem „OP-Cocktail“ (2 µl/g Körpergewicht) narkotisiert, der obere Abdomen mit einem vertikalen Schnitt geöffnet und die Blutzufuhr der Leber für eine Stunde unterbunden, indem die Leberarterie und die Portalvene, welche die oberen 3 Lappen der Leber versorgen, abgeklemmt wurde. Während des gesamten Versuchs wurde die Körpertemperatur mit einer Wärmelampe auf 37 °C gehalten. Nach einer Stunde wurden zur Reperfusion der Leber die atraumatischen Klemmen geöffnet und die Wunde verschlossen. Bei den Repopulationstieren wurden 3 h nach der Ischä-

mie-Reperfusions aus der Schwanzvene Vollblut entnommen und die Tiere nach 6 h getötet. Bei den Positiv- und Negativ-Kontrolltieren wurden 3, 6 und 12 h nach der Operation aus der Schwanzvene Vollblut gewonnen, um daraus das Serum zu isolieren. Die Tiere wurden 24 h nach der Leberschädigung getötet und das Gewebe für spätere histologische Untersuchungen entnommen (Abb. 15).

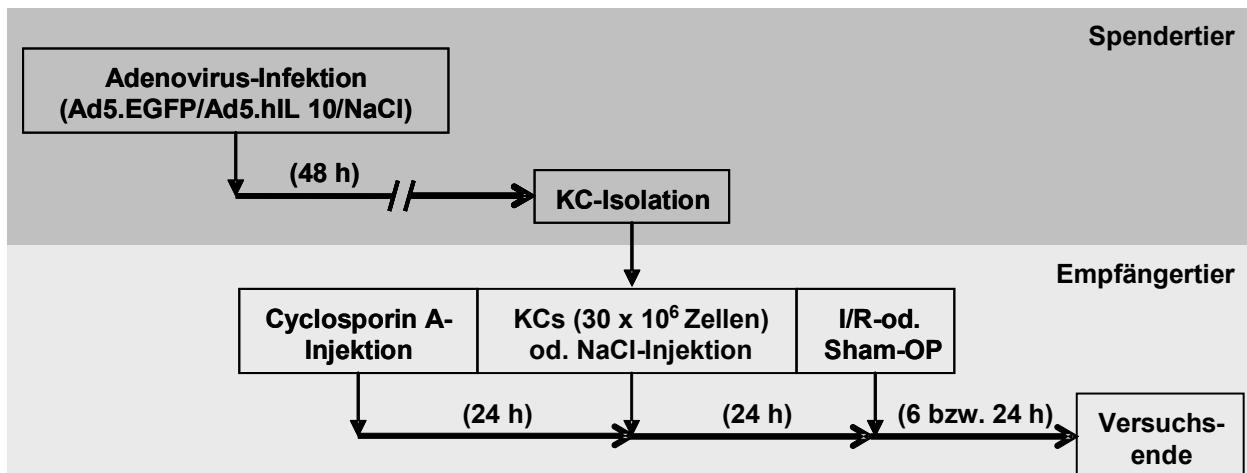


Abb. 15: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Repopulation von adenovirale transduzierten Kupffer-Zellen im Ischämie-Reperfusions-Schädigungsmodell der Leber.

4.2.9 Isolation von RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zelllysaten bzw. aus Gewebeproben erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit nach dem Spin-Protokoll. Diese Methode der RNA-Isolation beruht auf einer spezifischen Aufreinigung der Total-RNA über hydrophile Siliziumgelsäulen unter Verwendung geeigneter Puffersysteme. Zunächst wird das Gewebe bzw. werden die Zellen in 350 µl eines Guanidiniumisothiocyanat-enthaltenden Puffers durch einen Gewebeschredder bzw. durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren lysiert. Dieses chaotropen Salz denaturiert sämtliche Proteine inklusive RNAsen und gewährt somit die Isolation von intakter, nicht degraderter RNA. Die Gewebe- bzw. Zelllysate können bis zur eigentlichen RNA-Isolation bei -80 °C gelagert werden. Durch Zugabe von 350 µl 70-%igem Ethanol werden geeignete Bindebedingungen eingestellt und die Lysate anschließend auf die Säulen gegeben, an die spezifisch RNA-Moleküle mit einer Größe von mehr als 200 Nukleotiden binden. Die Lösung wird bei 8000 g für 15 sec zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen (15 sec, 8000 g). Durch Zugabe von 80 µl einer

DNase I-Lösung und Inkubation über 30 min bei Raumtemperatur wurden DNA-Verunreinigungen entfernt. Nach mehrmaligem Waschen mit RW1- und RPE-Puffer kann die hochwertige und reine Total-RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert werden. Die isolierte Gesamt-RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.2.10 Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung von RNA

Zur Bestimmung der Qualität der RNA für die Microarray Analyse wurde der Agilent 2100 Bioanalyzer zusammen mit einem RNA 6000 LabChip verwendet. Das Prinzip dieses *Lab-On-Chip* Verfahren beruht auf der Kapillarelektrophorese und der Detektion des in die RNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes PicoGreen. Dazu wird der Chip mit einem Fluoreszenz-Farbstoff-Gemisch beladen, die RNA-Proben (1 μ l) und ein Größenstandard (Leiter) werden in die entsprechenden Vertiefungen (Wells) auf dem Chip pipettiert. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes, erfolgt anschließend die Auf trennung der einzelnen Proben in einem Separationskanal, wohin sie nacheinander durch Mikrokapillaren gelangen. Die Ergebnisse werden aufgezeichnet und die Analyse erfolgt mit Hilfe der Agilent 2100 BioAnalyzer Software. Dabei wird mit einem speziellen Algorithmus das gesamte Elektropherogramm ausgewertet und daraus eine sogenannte RNA integrity number (RIN) berechnet, wobei die Werte auf einer Skala von 1 (vollständige Degradation) bis 10 (optimale Qualität) liegen. Dies ermöglicht eine objektive und reproduzierbare Aussage über die Qualität der RNA.

Die Konzentration von RNA-Lösungen wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in je 1,5 μ l Volumina mit dem NanoDrop ND-1000 bestimmt. Das Prinzip dieser zuverlässigen und genauen Methode beruht darauf, dass Licht einer bestimmten Wellenlänge, die möglichst beim Absorptionsmaximum der zu untersuchenden Substanz liegen sollte, beim Durchgang durch wässrige Lösungen abgeschwächt wird. Diese Absorption ist abhängig von der Konzentration der untersuchten Substanz, ihrem spezifischen Extinktionskoeffizienten und der durchstrahlten Flüssigkeitsdicke. Die folgende Gleichung beschreibt den dargelegten Zusammenhang:

$$A = \epsilon \times c \times D \quad (\text{Lambert-Beersches-Gesetz})$$

A: Extinktion, ϵ : molarer Extinktionskoeffizient ($\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), c: Konzentration der absorbierenden Moleküle (mol/L), D: durchstrahlte Flüssigkeitsschichtdicke (cm)

Aus dieser Beziehung lässt sich bei konstanter Schichtdicke (1,0 mm) und gegebenem Extinktionskoeffizienten (abhängig von der verwendeten Wellenlänge und den Eigenschaften der Substanz) durch Bestimmung der Absorption die Konzentration berechnen:

$$c = (A \times e)/b$$

c: Konzentration der absorbierenden Moleküle (ng/ μl), A: Extinktion, e: Extinktionskoeffizient (ng-cm/ μl), b: durchstrahlte Flüssigkeitsdicke (cm)

Der Extinktionskoeffizient der RNA beträgt bei einer Wellenlänge von 260 nm, was dem Absorptionsmaximum von Purin- und Pyrimidinbasen entspricht, 40 ng-cm/ml. Als Blank diente RNase-freies Wasser.

4.2.11 Reverse Transkription

Das Umschreiben von RNA in komplementäre cDNA erfolgte mit dem Reverse Transcription System Kit der Firma Promega. Ausgangsmenge war 1 μg GesamtRNA, die mit RNase-freiem H_2O auf ein Gesamtvolumen von 10 μl gebracht wurde. Dem Ansatz wurden 5 μl MgCl_2 (25 mM), 2,5 μl 10 x Reverse Transcription Puffer, 2 μl dNTP Mix (10 mM), 0,625 μl rekombinanter RNasin Ribonuklease Inhibitor, 1,0 μl AMV Reverse Transkriptase (aus *avian myoblastosis virus*), 1,25 μl Oligo (dT₁₈)-Primer und 2,125 μl H_2O zugesetzt. Die Proben wurden für 30 min bei 42 °C (Umschreiben der RNA in cDNA) inkubiert und anschließend zur Denaturierung der reversen Transkriptase für 5 min auf 99 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 4 °C wurde die cDNA direkt zur Amplifizierung eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.2.12 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR dient der Amplifikation (bis Faktor 10^8) von DNA-Fragmenten (116; 117), wobei neben der DNA-Matrize (Templat) 2 flankierende Oligonukleotide (Primer) benötigt werden. Diese Primer sind dem jeweiligen 3'-Ende des Templates komplementär. Durch wiederholte cyclische Ausführung von Denaturierung, Primeranlagerung (Annealing) und DNA-Synthese (Extension) mit Hilfe einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase kann eine exponentielle Vervielfältigung der Ausgangs-DNA erreicht werden.

Der PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Taq PCR Master Mix Kit	10,0 µl
Primer forward (20 µm)	0,5 µl
Primer reverse (20 µm)	0,5 µl
H ₂ O	7,0 µl
cDNA	2,0 µl

PCR-Bedingungen:

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min
3 Schritt-Zyklus (35 Zyklen):		
Denaturierung	94 °C	30 sec
Annealing	je nach Primerpaar: ca. 2 °C unterhalb der Schmelztemperatur	30 sec
Extension	72 °C	Zeit je nach Anzahl bp der zu amplifizierenden DNA: Pro 1 kb 60 sec
Finale Extension	72 °C	10 min
	4 °C	∞

4.2.13 Nicht denaturierende Agarosegelelektrophorese

Die analytische Trennung von DNA-Proben erfolgte unter nicht denaturierenden Bedingungen mittels Agarosegelelektrophorese. Es wurden 2-%ige Gele (w/v) verwendet, die durch Aufkochen einer eingewogenen Menge Agarose in 1 x TAE-Puffer hergestellt wurden. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurde Ethidiumbromid zugefügt und die Gele in horizontale Gelkammern ausgegossen. Die interkalierende Eigenschaft von Ethidiumbromid lässt den Nachweis von Nukleinsäuren als leuchtende Banden unter UV-Durchlicht bei einer Wellenlänge von 254 nm zu. Nach der Verfestigung des Gels wurde die Laufkammer mit 1 x TAE-Puffer gefüllt. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Ladepuffer versetzt und in die Probentaschen pipettiert. Als Längenstandards wurden 100 bp DNA-Leiter verwendet. Die eigentliche Elektrophorese erfolgte bei 100 bis 120 V.

4.2.14 DNA-Microarray Analyse

Für die genomweiten Expressionsanalysen wurde der GeneChip HGU133 Plus 2,0 der Firma Affymetrix verwendet. Dieses DNA-Microarray Set umfasst rund 38500 bekannte humane Gene. Die genspezifischen Oligonukleotide werden durch ein photolithographisches Verfahren *in situ*, d.h. direkt auf der Chip-Oberfläche, synthetisiert. Ausgehend von 1 µg Total-RNA wird im ersten Schritt unter Verwendung eines T7-oligo-d(T)₂₄ Primers doppelsträngige cDNA synthetisiert. Als Konsequenz daraus tragen alle gebildeten cDNA Moleküle den bakteriophagen T7-Promotor. Nach einem Aufreinigungsschritt produziert die T7-RNA-Polymerase in der anschließenden *in vitro* Transkription biotinylierte cRNA. Im Gegensatz zur cDNA Synthese kommt es hierbei zu einer 100- bis 200-fachen Amplifikation, da ein cDNA Molekül mehrere Male als Matrize dienen kann. Die cRNA wird aufgereinigt, durch eine metallische Hydrolyse auf eine durchschnittliche Länge von 35 bis 200 Nukleotide fragmentiert und für 16 h bei 45 °C und 60 U/min in einem Hybridisierungscocktail auf die DNA-Microarrays hybridisiert. Danach werden die Arrays gewaschen, mit einem Streptavidin-Phycoerythrin Komplex gefärbt und gescannt.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurden humane KCs von je einem Patienten mit einer Leberzirrhose (Child C, Diagnose: sekundär sklerosierende Cholangitis) mit „Kontroll“-KCs (isoliert aus den freien Resektaträndern eines Patienten mit Leberzell-

resektion bei einer Lebermetastase) verglichen. Aus den gescannten Bildern wurden mit der Microarray Suite 5.0 Software (Affymetrix, USA) die Expressionssignale sowie der *detection call* berechnet. Der *detection call* sagt aus, ob ein Gen exprimiert (*present*: P), schwach exprimiert (*marginal*: M), oder nicht exprimiert (*absent*: A) wird. Jeder DNA-Microarray wurde zunächst einzeln analysiert, wobei die Gesamtfluoreszenz jeweils auf den Wert 100 skaliert wurde (*single array analysis*). Die zusätzlich generierte Report Datei erlaubte eine ausführliche Qualitätskontrolle, wobei dem Skalierungsfaktor, der Hintergrundfluoreszenz, den Signalwerten der Hybridisierungskontrollen und den 3'-5' Verhältnissen der internen Kontrollen die größte Bedeutung zukam. Der niedrigste Wert des Skalierungsfaktors unterschied sich nicht mehr als um den Faktor 2 vom höchsten, was eine gute Vergleichbarkeit der einzelnen DNA-Microarrays untereinander gewährleistete. Die Werte für die unspezifische Hintergrundfluoreszenz lagen ebenfalls unterhalb des Grenzwertes, was eine spezifische Hybridisierung beweist. Sämtliche Hybridisierungskontrollen, welche vor der Hybridisierung in unterschiedlichen Konzentrationen eingespiked wurden, konnten als exprimiert detektiert werden. Somit wurde sichergestellt, dass auch sehr niedrig exprimierte Gene ein messbares Signal zeigten. Bei den internen Kontrollen β -Actin und Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurden jeweils Expressionssignale am 3'- und am 5'-Ende bestimmt. Aus dem berechneten 3' zu 5' Verhältnis, das den Faktor 3 nie überschritt, konnte eine nicht vollständige cDNA- bzw. cRNA Synthese ausgeschlossen werden. Im zweiten Schritt wurde die Zirrhose-Probe jeweils auf die gesunde Kontrollprobe bezogen (*comparison analysis*). Dabei wurde der *change call* berechnet, der angibt, ob es zu einer Erhöhung (*increase*: I bzw. *minor increase*: MI), zu einer Verminderung (*decrease*: D bzw. *minor decrease*: MD) oder zu keiner Veränderung (*no change*: NC) der Transkription kam. Zusätzlich wurde die Höhe der Expressionsänderung als Zahlenwert angegeben (*fold change*). Alle Daten wurden als *fold changes* der Transkript-Level bezogen auf die jeweilige Kontrolle angegeben. Die Pathway-bezogene Auswertung wurde mit Hilfe der frei zugänglichen David Software durchgeführt (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>). Das Programm bietet dem Benutzer u.a. die Möglichkeit, durch Verknüpfung der hoch- bzw. runterregulierten Gene des Chips mit z.B. Signaltransduktionswegen, nach Auffälligkeiten in der Genregulation zu suchen.

4.2.15 Proteinisolation

Das zu untersuchende Lebergewebe wurde entnommen und Fett-, Bindegewebs- sowie Blutreste entfernt. Anschließend wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff nativ eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Homogenisierung der Gewebeprobe erfolgte in einem Ripa-Puffer. Um den Abbau von Proteinen zu hemmen, führte man zum einen die komplette Proteinaufreinigung auf Eis durch und zum anderen wurde zu 10 ml des Zelllysepuffers eine Tablette Proteaseinhibitor (gelöst in 1,5 ml Aqua dest.) zugefügt. Der Aufschluss des Gewebes erfolgte in einem Gewebeschredder, wobei pro Gewebestück 0,5-1,0 ml Ripa-Puffer benötigt wurden. Daran anschließend wurden die Proben bei 15000 g in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge für 10 min zentrifugiert. Dadurch wurden Zelltrümmer und Zellorganellen sedimentiert und im Überstand, der im folgenden Schritt abdekantiert wurde, befanden sich die Proteine.

4.2.16 Quantitative Messung von Proteinen

4.2.16.1 Proteingehaltsbestimmung

Bei der Proteingehaltsbestimmung wird Cu^{2+} (copper (II) sulfat pentahydrate 4 % (w/v) solution) in alkalischer wässriger Lösung durch Proteine zu Cu^{1+} reduziert, das einen farbigen Komplex mit jeweils 2 Molekülen bicinchonic acid solution (BCA) bildet. Dazu wurden 10 μl Probe mit 200 μl BCA: Cu^{2+} (50:1) Mischung für 30 sec geschüttelt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Entstandene Farbkomplexe wurden anschließend mit einem Absorptionspektrometer (ELISA-Reader Emax) bei 540 nm vermessen.

Absolute Werte für den Proteingehalt wurden durch die Messung einer Konzentrationsreihe einer BSA-Standardlösung erstellt. Durch Auftragung der Absorption gegen den Proteingehalt der Verdünnungsreihe erhielt man eine Eichgerade, aus der der Gesamtproteingehalt der Probe ermittelt werden konnte.

4.2.16.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die quantitative Messung von IL 6, IL 10, und TNF α aus Überständen von Stimulationsversuchen der KC-Kulturen bzw. aus Serumproben der Tierexperimente erfolgte mit dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay.

Bei der Messung legte man in jede Vertiefung einer 96-Well-Platte 100 μ l der Probe in Duplikaten vor. Die Platte wurde bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. In jede Vertiefung wurden im Anschluss 100 μ l des biotinylierten Antikörper Reagenz gegeben und vermischt. Es erfolgte eine weitere Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Platte wurde anschließend dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Zu jeder Probe wurden 100 μ l der Strepavidin-HRP-Lösung gegeben und die Platte erneut für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 100 μ l der TMB-Substrat-Lösung zugegeben und es erfolgte eine weitere 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Zum Abschluss wurde die Reaktion mit 100 μ l stop-solution abgebrochen. Entstandene Farbkomplexe wurden anschließend mit einem Absorptionspektrometer (ELISA-Reader, Emax precision microplate reader) bei 450 nm vermessen. Sämtliche Auswertungen der Messungen wurden mit der Software Softmax for Windows (Version 2.35) durchgeführt.

4.2.17 Western Blot

Bei dieser Technik werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Trägerschicht aus Nitrocellulose transferiert und somit immobilisiert. Dadurch wird das hohe Trennungsvermögen der Gelelektrophorese mit der Möglichkeit kombiniert, die übertragenen Moleküle auf einfache Weise spezifisch, qualitativ und quantitativ zu analysieren. Bei dem hier durchgeführten Western Blot wurden die fertigen Gele (NuPAGE Bis-Tris Gel, 4-12 %; 1,0 mm*10 Well) und auch die fertigen Puffer der Firma Invitrogen eingesetzt. Entsprechend wurde nach dem von der Firma angegebenen Protokoll verfahren. Das Gesamtprobenvolumen, das pro Geltasche eingesetzt wurde, betrug 40 μ l. Die Proteinmenge belief sich auf 50 μ g je Probe, wobei die Differenz mit Aqua dest. aufgefüllt wurde. Zusätzlich mit einzurechnen waren 10 μ l NuPAGE SDS Sample Buffer (4 x) und 4 μ l NuPAGE Reducing Agent (10 x). Um die Proteine zu denaturieren, wurden die Proben für 10 min auf 95 °C erhitzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Neben den Proben wurde auch der Standard

(SeeBlue Plus2 pre-stained, 191-11 kDa) mit einem Volumen von 10-15 µl eingesetzt. Der Puffer (NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20 x)) wurde mit Aqua dest. 1/20 auf insgesamt 1 l verdünnt und in die beiden Kammern der Gelapparatur gegeben, wobei bei der inneren Kammer 500 µl NuPAGE Antioxidant zugesetzt werden musste. Bei einer Stromstärke von 120 mA benötigten die kleinsten Proteine ca. 45-60 min, um den unteren Rand des Gels zu erreichen.

Im Anschluss daran wurde der eigentliche Blot auf die Nitrocellulose vorbereitet. Das jeweilige Pufferkonzentrat (NuPAGE Transfer Buffer (20 x)) wurde entsprechend auf 1 l verdünnt. Dabei mussten 100 ml Methanol/Gel und 1 ml NuPAGE Antioxidant mit berücksichtigt werden.

Bevor der semi-dry Blot zusammengebaut wurde, mussten die Schwämme, Filter und Membranen mit NuPAGE Transfer Buffer getränkt werden. Der Blot wurde anschließend wie folgt zusammengebaut: 2 Schwämme-Filter-Membran-Gel-Filter-2 Schwämme. Die Stromstärke wurde pro Gel auf 110 mA eingestellt. Nach maximal einer Stunde war der Transfer beendet und, die Kammer konnte auseinandergebaut werden. Danach wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 % Milchpulver, angesetzt mit Waschpuffer, geblockt. Im folgenden Schritt wurde die Blocklösung durch den Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung mit 5 % Milchpulver ersetzt. Wieder erfolgte die Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Durch 3 x 10 min Waschen mit dem Waschpuffer wurden nicht gebundene Reste des primären Antikörpers entfernt, bevor der Sekundärantikörper, der mit horseradish peroxidase (HRP) konjugiert war, in einer 1:5000 Verdünnung in 5 % Milchpulver, auf die Membran gegeben wurde. Erneut wurde die Membran dreimal für 10 min mit dem Waschpuffer gewaschen bevor die Detektion mit dem ECL Plus Western blotting detection System erfolgte. Die Inkubationsdauer betrug 1,5 min. Danach konnte die Membran mittels eines BiomaxFilmes, 20,3 cm x 25,4 cm, und des Entwicklers Curix 60 von Agfa ausgewertet werden.

4.2.18 Histologie

Bei den Tierversuchen erfolgte die Entnahme der Leber, Lunge und Milz zu den jeweiligen Endpunkten. Die Gewebe wurden zum einem nativ weggefroren, was bedeutet, dass sie nach Entnahme aus dem Tier sofort in Tissue Tek® mittels flüssi-

gem. Stickstoff eingefroren wurden. So behandelt konnte das Gewebe mehrere Monate bei -20°C aufbewahrt werden. Um immunhistologische Färbungen anzufertigen, wurden von den Tissue Tek®-Blöcken am Kryotom 5-8 μm dicke Präparate angefertigt und auf einem beschichteten Objektträger (Super Frost Plus®) aufgenommen.

Alternativ konnte das Gewebe auch durch Transfer in Formalinlösung (3,7 %) über 24 h fixiert werden. Letzteres erfolgte zur Vereinfachung des weiteren Vorgehens im Verlauf der Methodik in kleinen Einbettkassetten, die direkt für die folgende Paraffinbehandlung verwendet werden konnten. Die Entwässerung und Paraffineinbettung der Gewebestücke wurde in einer automatischen Einbettvorrichtung (Hypercenter) durchgeführt, wobei die Proben folgende Schritte durchliefen: Ethanol 70 % 3 x 1 h, Ethanol 96 %, Ethanol absolut 2 x 1,5 h sowie 2 abschließende Inkubationen in Xylol (je 1,5 h). Die auf diese Weise entwässerten Proben führte man nun für 1,5 h und 2 h sowie abschließend für mindestens 2 h bis zur weiteren Aufarbeitung in flüssiges Paraffin (60°C) über. Nach Entfernung der Plastikgitterboxen folgte die Paraffineinbettung, der sich eine 24-stündige Ruhephase anschloss, in der das Paraffin aushärtete. Die Anfertigung der histologischen Gewebeschnitte mit einer Dicke von etwa 5 μm erfolgte mit Hilfe eines Mikrotoms. Die frisch hergestellten Schnitte wurden auf einem warmen Wasserbad (43°C) für wenige Sekunden sanft gestreckt, um die beim Schneiden entstandene Stauchung aufzuheben, auf einen Objektträger aufgezogen und zum Trocknen für 3-4 h in einen Wärmeschrank (75°C) gestellt.

Nach einer Entparaffinierung der Schnitte durch eine fünf- und eine einminütige Inkubation in Xylol wurden die Proben durch Hydrierung in einer Reihe absteigender Ethanolkonzentrationen (Ethanol absolut, 90 %, je 2 x 1 min, 70 %, 30 sec) auf die Färbung vorbereitet.

Hematoxylin/Eosin-Färbung:

Hematoxylin färbt Zellkerne und Zytoplasmaanteile, die reich an rauem endoplasmatischen Retikulum sind, blau-violett. Eosin hingegen färbt andere Zytoplasmaanteile sowie viele faserige extrazelluläre Komponenten rot. Die rehydrierten Gewebeschnitte wurden für 5 min in Mayer's Hematoxylin-Solution gefärbt und dann für 3 min in fließendem, handwarmem Wasser gebläut. Daran anschließend folgte eine 30 sec lange Färbung in 1 % Eosin.

Methylgrün-Färbung:

Methylgrün färbt DNA bläulich-grün an. Diese Färbung ist eine übliche Methode zur Hintergrundfärbung von Gewebeschnitten. Für die Färbung wurden die Präparate 3-5 min in der Färbelösung gelassen und danach kurz mit Wasser gespült, dehydriert und entalkoholisiert.

Zur Dehydrierung und Entalkoholisierung durchliefen die Schnitte nun folgende Behandlungen. In einer aufsteigenden Alkoholreihe, beginnend mit jeweils zweimal 70 % über zweimal 90 %, zweimal 100 % Ethanol und endend mit zweimal Xylol, wurde überschüssiger Farbstoff entfernt und die Schnitte entwässert. Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte mit Deckgläsern und Entellan eingedeckt. Nach einer Trocknungszeit von mehreren Stunden konnten die Schnitte unter dem Lichtmikroskop ausgewertet werden.

4.2.19 Bestimmung von Serumwerten

Sämtliche Schritte bei der Gewinnung des Serums wurden auf Eis ausgeführt.

Vollblut wurde bei den Tierversuchen über eine Schwanzvene bzw. die Vena cava inferior zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen. Nach Zentrifugation bei 1700 g für 15 min wurde das Serum abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C weggefroren. Die Bestimmung der Aspartat Aminotransferase (AST = GOT) und der Alanin Aminotransferase (ALT = GPT) erfolgte gemäß Standardprotokollen in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Chemie des Klinikums der Universität Regensburg. Die Serumproben wurden dabei im Verhältnis 1:3 bzw. 1:6 mit PBS 1 x verdünnt und die Messungen wurden im Rahmen der täglichen „Routine“ durchgeführt.

4.2.20 Statistische Auswertung

Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung bzw. Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney U Test bestimmt, wobei das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$ lag.

Bei den Box Plots zeigt die durchgezogene Linie den Median jeder Gruppe an, durch die Kanten des Boxplot wird die 25ste und 75ste Percentile dargestellt, die horizontalen Linien zeigen die 5te und 95ste Percentile an.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Instant 3 für Macintosh (GraphPad Software) und als Grafikprogramm wurde Prism 4 für Macintosh (GraphPad Software) verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Isolation von Kupffer-Zellen

Kupffer-Zellen wurden mit geringen Änderungen nach dem Isolations-Protokoll von Smedsrød und Pertoft gewonnen (siehe Materialien und Methoden) (111; 112). Die Methode basiert prinzipiell auf einer Kollagenase-Perfusion der Leber, isopyknischer Sedimentation in einem geeigneten Medium (Percoll®) und selektiver Adhäsion der Zellen in Kultur. Für nachfolgende Untersuchungen, speziell für die Evaluation KC-spezifischer Effekte im Repopulationsmodell war es hierbei von entscheidender Bedeutung, eine reine und funktionell intakte Zellpopulation zu isolieren. Die Reinheit und Vitalität wurde zunächst im Rahmen der Isolation mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Über 95 % der Zellen wiesen dabei die typische Morphologie von KCs auf, wobei durch den Isolationsprozess nur eine geringe Anzahl der Zellen sich blau anfärbten und somit ausgeschlossen werden mußten. Da dies allerdings nur eine sehr einfache Methode der Reinheits- und Vitalitätsbestimmung darstellt, wurden zum weiterführenden Ausschluß von Verunreinigungen (u.a. Hepatozyten, Sternzellen, Zelldebris) die im Kapitel 4.2.6 beschriebene Phagozytose von fluoreszierenden Latex-Beads, welche selektiv nur von KCs aufgenommen werden, angeschlossen. Zur Detektion von Hepatozyten-Verunreinigungen wurden die Zellpopulationen zusätzlich mit Resorufin- β -D-Glucosid (0,1 mM), einer Substanz welche nur Hepatozyten markiert, inkubiert und entsprechend durch Fluoreszenzmikroskopie (FITC- oder Texas Rot-Filter) ausgewertet (Abb. 16). Über 95 % der Zellen nahmen dabei die FITC-markierten Beads auf, was auf eine ausreichend vitale und weitgehend frei von Zellverunreinigungen bestehende KC-Population hindeutet.

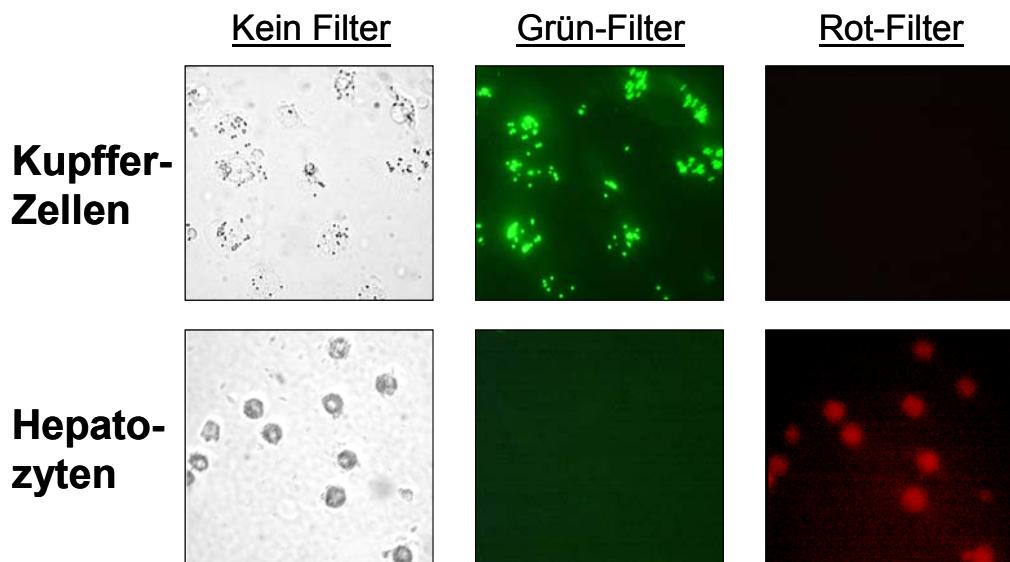


Abb. 16: Bestimmung der Reinheit der KC-Population: Die Zellen wurden wie im Material- und Methoden-Teil beschrieben isoliert, ausgesät und für 24 h inkubiert. Die Hepatozyten wurden dann mit Resorufin- β -D-Glucosid (0,1 mM), einer Substanz, welche nur Hepatozyten markiert, gefärbt. Zur Identifizierung der KCs wurden außerdem FITC-markierte Latex-Beads zugesetzt. Die Abbildungen zeigen repräsentative Bilder der Fluoreszenzmikroskopie.

Ferner wurden zur Feststellung von eventuellen Isolationsschäden an der Zytosmamembran der KCs, FACS-Analysen von spezifischen Oberflächenmarkern durchgeführt. Für diesen Zweck wurde zunächst bei Ratten-KCs zur eindeutigen Bestimmung der Zellpopulation in der Dot Plot-Auswertung des FACS (FS gegen SS) ein MACS-Aufreinigungsschritt durchgeführt (Abb. 17). Die so aufgereinigten Zellen wurden mit einem anti-rat CD 68 FITC-markierten Antikörper für 30 min inkubiert (bzw. Isotyp-AK: Maus IgG1 FITC). CD 68 ist ein 110 kDa großes Transmembran-Glykoprotein, welches in Monozyten und gewebsständigen Makrophagen sowohl an der Zelloberfläche als auch intrazellulär hoch exprimiert ist. Bei humanen KCs wurden nach Percoll®-Isolation eine CD 33 PE-Markierung (bzw. Isotyp-AK: Maus IgG1 PE) durchgeführt und die Zellen anschließend im Phycoerythrin-Kanal vermessen. CD 33 ist wiederum ein Oberflächenmarker für Monozyten und Makrophagen. Der erhaltene Shift im FITC-Kanal bzw. im PE-Kanal verdeutlicht (Abb. 18/19), dass durch den Isolationsvorgang offensichtlich keine nennenswerten Schäden an der Oberfläche der Ratten- und humanen KCs entstanden sind.

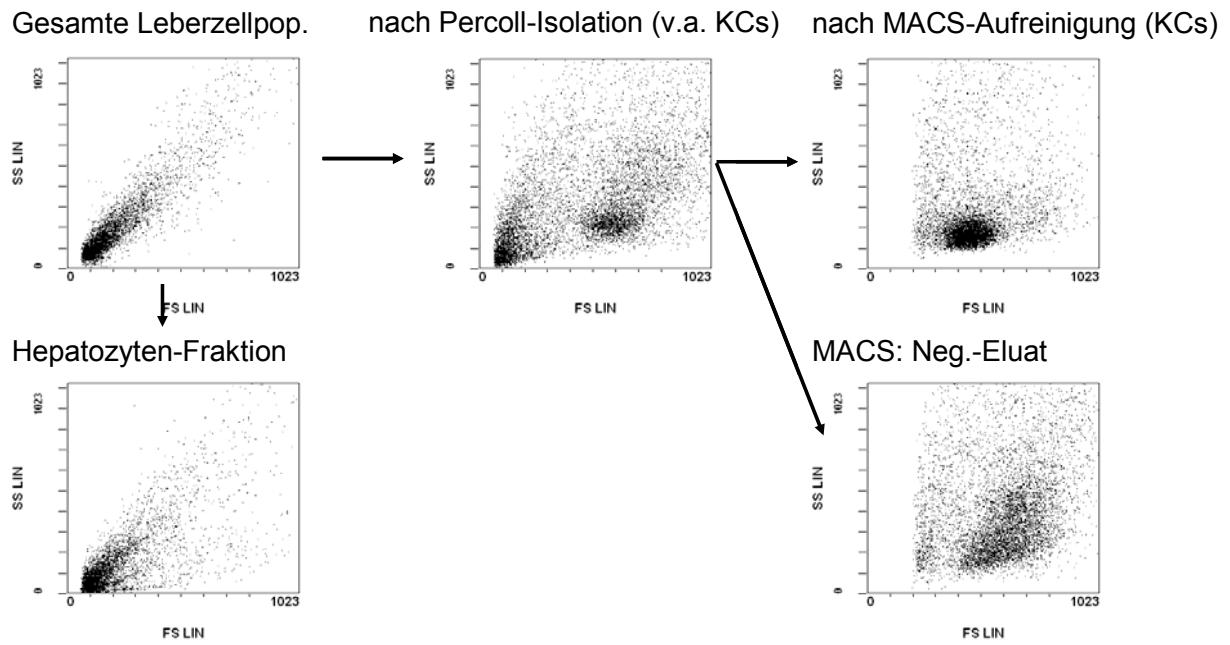


Abb. 17: FACS-Analyse des Isolations- und Aufreinigungsprozesses von Ratten-KCs. Dargestellt sind repräsentative Forward Scatter- (FS-) gegen Sideward Scatter- (SS-) Aufnahmen. Der MACS-Aufreinigungsschritt führt zu einer Optimierung der Lagebestimmung der KC-Population in der Dot Plot Auswertung des FACS.

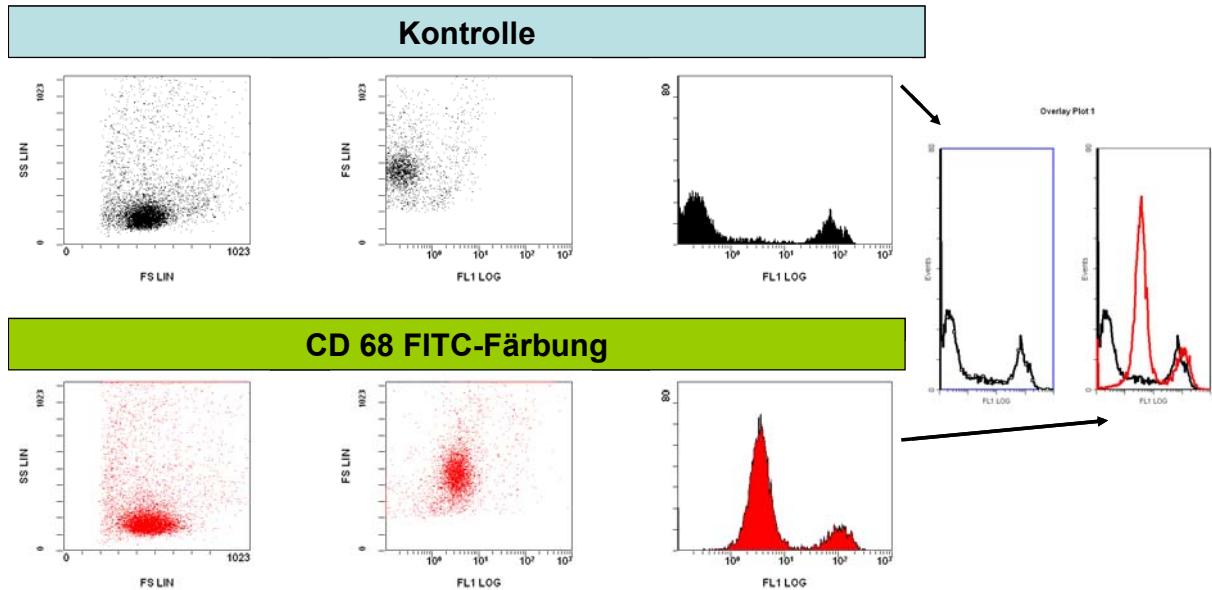


Abb. 18: FACS-Analyse von Ratten-KCs zur Bestimmung von eventuellen Isolationschäden mittels CD 68 FITC-Färbung. Die Ratten-KCs wurden nach einem Blockierungsschritt für 30 min mit einem FITC-markierten CD 68 Antikörper (bindet an das entsprechende Transmembranprotein von KCs) inkubiert und der Shift im FITC-Kanal bestimmt.

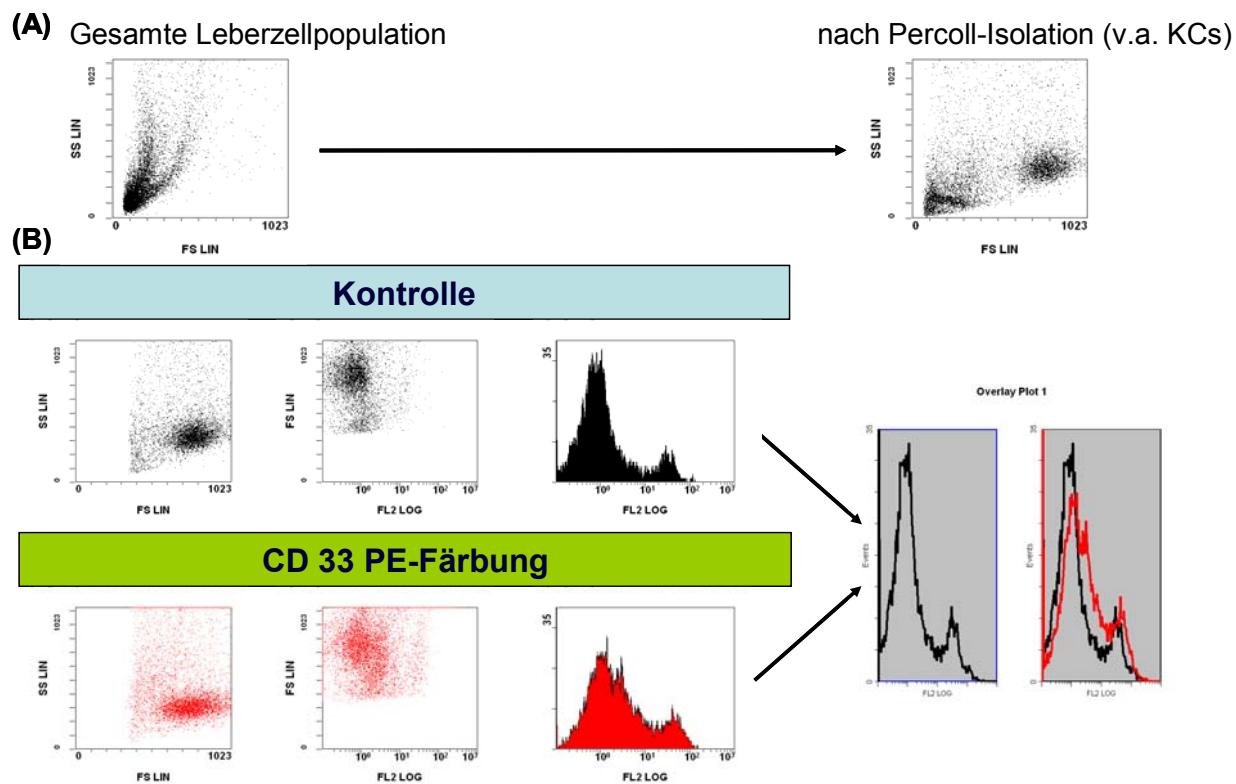


Abb. 19: FACS-Analyse des Isolationsprozesses von humanen KCs und CD 33 PE-Färbung der humanen KC-Population zur Bestimmung von eventuellen Isolationsschäden. Dargestellt sind repräsentative Forward Scatter- (FS-) gegen Sideward Scatter- (SS-) Aufnahmen der Isolation von humanen KCs **(A)**. Die humanen KCs wurden nach einem Blockierungsschritt für 30 min mit einen PE-markierten CD 33 Antikörper inkubiert und der Shift im PE-Kanal bestimmt **(B)**. CD 33 ist ein Transmembranprotein von KCs.

Die Vitalität der KCs wurde weiterhin 24 h nach der Isolation durch die Stimulation mit dem Endotoxin LPS (10 μ g/ml) oder PBS als Kontrolle überprüft. Die KCs sind durch den Isolationsvorgang zu einem gewissen Maß vorstimuliert, weshalb für *in vitro* Versuche eine 24-stündige Ruhepause eingehalten wurde. LPS ist ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien. Es führt zur Aktivierung der Makrophagen und letztendlich u.a. zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie z.B. TNF α . Nach 24-stündiger Stimulation wurden die Zytokinspiegel im Überstand der KC-Kulturen mittels ELISA gemessen (Abb. 20). Der erwartete Anstieg in den Zytokinlevels beweist erneut, dass die Isolationsmethode eine funktionell intakte Zellpopulation liefert, die für weiterführende Experimente verwendet werden kann.

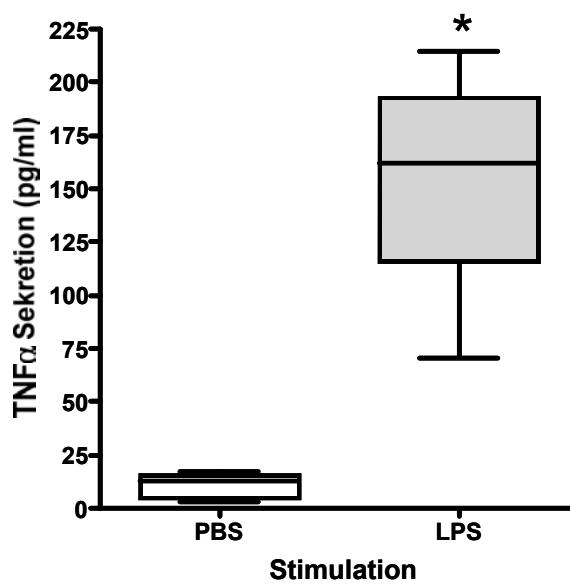


Abb. 20: Zytokinsekretion von Ratten-KCs nach LPS-Stimualtion. TNF α -Sekretion von Ratten-KCs nach 24-stündiger LPS-Stimulation (10 μ g/ml) bzw. PBS als Kontrolle. Die Zytokinspiegel im Überstand wurden mittels ELISA bestimmt ($n = 6$ pro Gruppe, $*p < 0,05$ bezogen auf die Werte der PBS-Kontrollgruppe).

5.2 Transplantation von Ratten-Kupffer-Zellen (allgemein)

5.2.1 Repopulation von Karbon-markierten Kupffer-Zellen in Ratten-Lebern

Um die Hypothese zu testen, dass Spender-Kupffer-Zellen in der Leber eines Empfängers angesiedelt werden können, wurden Kupffer-Zellen des Spender-Tieres (männliche SD-Ratten) mittels Karbonpartikel *in vivo* markiert. Nach 24 h erfolgte die Isolierung und intravenöse Injektion der so markierten Zellen (30×10^6) in den Empfänger. Die Empfängertiere wurden 24 h vorher entweder durch eine einmalige Gabe des Immunsuppressivums Cyclosporin A (10 mg/kg Tier, i.p.) oder Gadoliniumchlorid (10 mg/kg Tier, i.p.) bzw. einer Kombination von beiden vorbehandelt. Die Gabe von Gadoliniumchlorid führt zur Depletion der Kupffer-Zellen der Empfängertiere, wodurch eine Erhöhung der Repopulationsrate beabsichtigt wurde. Durch die unterschiedlichen Vorbehandlungen der Empfängertiere sollten die optimalen Repopulationsbedingungen für nachfolgende Untersuchungen herausgefunden werden. 24 h nach KC-Transplantation erfolgte die Tötung der Empfängertiere zur Serum- und Organentnahme. Als entsprechende Kontrollgruppen wurden direkt mit Karbonsus-

pension- (Positiv-Kontrolle) oder Trägerlösung- (0,9-%ige NaCl-Lösung, Negativ-Kontrolle) injizierte Tiere mitgeführt (Abb. 21).

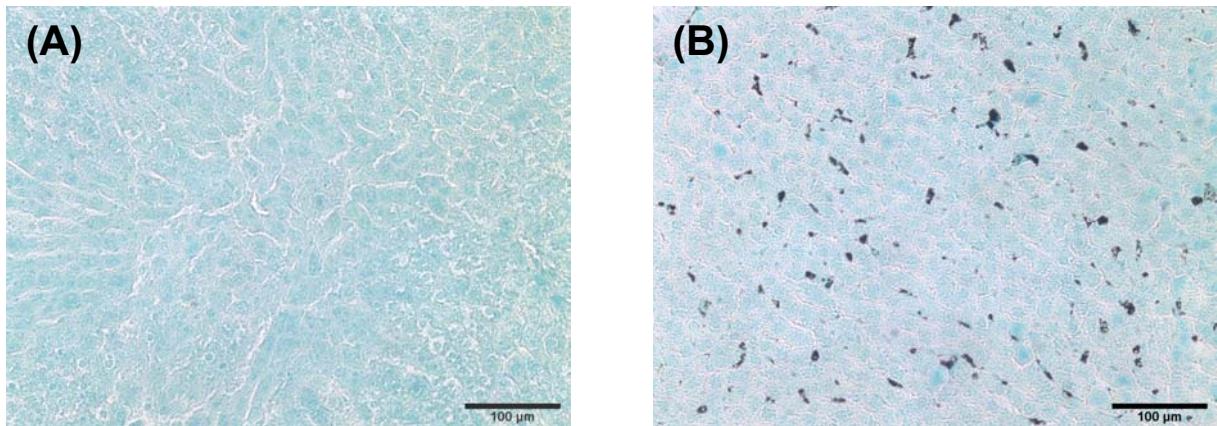


Abb. 21: Lokalisation Karbon-markierter KCs in der Leber. Lebergewebe nach (A) Injektion einer Trägerlösung (0,9-%ige NaCl-Lösung, Negativ-Kontrolle) oder (B) direkter systemischer Karbon-injektion (Positiv-Kontrolle). (Repräsentative Histologie, Vergrößerungsfaktor 200 x).

Die transplantierten KCs wurden in der Leber des Empfängers als Karbon-positive Zellen mittels Methylgrün-Gegenfärbung identifiziert und in der Folge quantifiziert. Bei einer initialen Aufnahmeeffektivität von Karbon der Spender-KCs von ca. 70 % konnten im Mittel ca. 23 % der transplantierten KCs in den Empfängerlebern nachgewiesen werden (Tab. 5). Es zeigten sich jedoch, abhängig von der entsprechenden Vorbehandlung des Empfängers, wesentliche Unterschiede in der Repopulationsrate sowie der daraus resultierenden Ansiedlungseffizienz der transplantierten KCs (Abb. 22). So führte die Vorbehandlung der Empfänger durch eine einmalige Gabe von Cyclosporin A zu einer signifikanten Steigerung sowohl der KC-Repopulationsrate als auch der KC-Ansiedlungseffizienz der transplantierten KCs im Vergleich zu Empfängertieren, die mit Gadoliniumchlorid alleine oder einer Kombination von Cyclosporin A und Gadoliniumchlorid vorbehandelt wurden (Tab. 5).

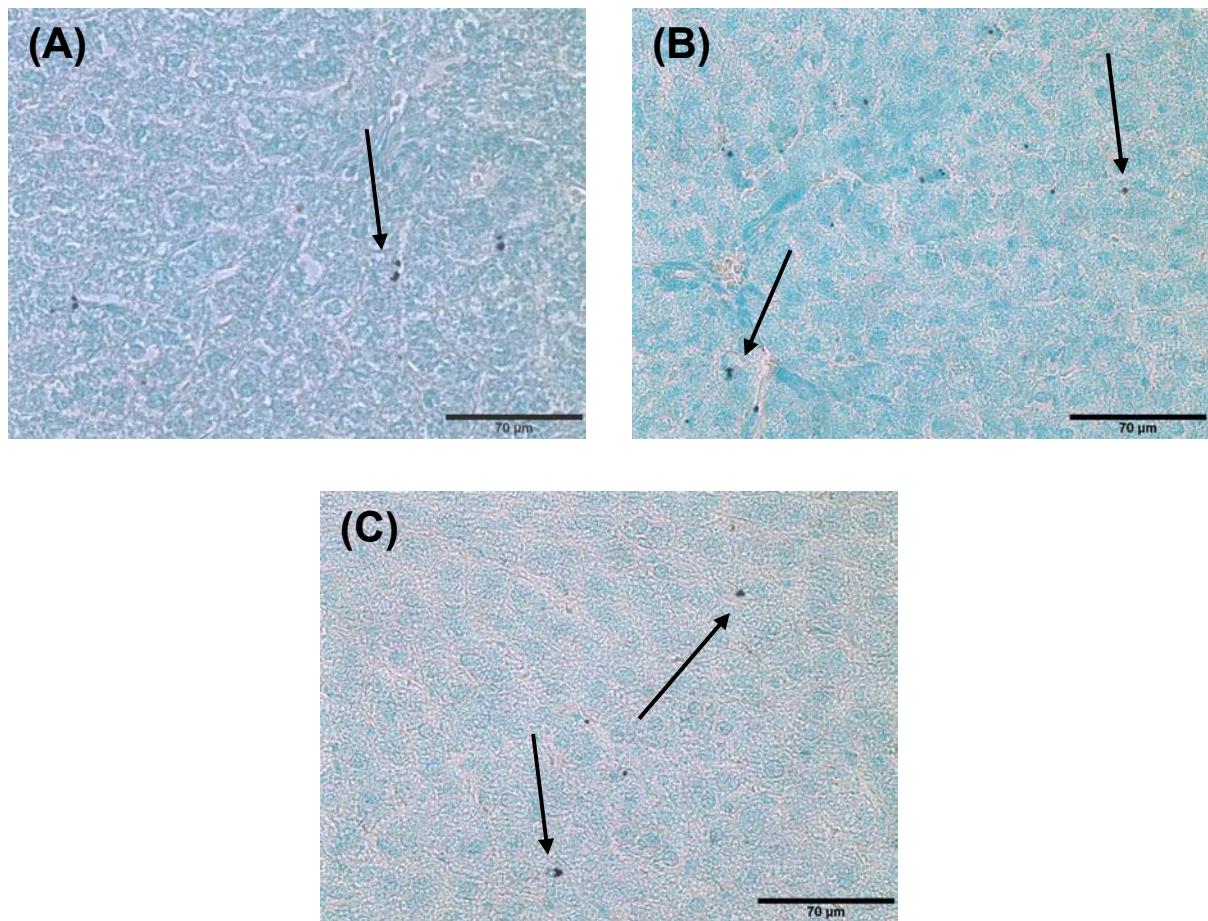


Abb. 22: Lokalisation Karbon-markierter KCs in der Leber des Empfängers nach KC-Injektion.
 Empfängerleber nach Transplantation Karbon-markierter KCs und Empfängervorbehandlung mit (A) Cyclosporin A, (B) Gadoliniumchlorid oder (C) Cyclosporin A + Gadoliniumchlorid. (Repräsentative Histologie, Vergrößerung 400 x).

Injektion von 30×10^6 KCs pro Empfänger			
Empfängervorbehandlung mit			
	Cyclosporin A	Gadoliniumchlorid	Cyclosporin A + Gadoliniumchlorid
Anzahl der Karbon-markierten			
KCs im Empfänger (in Mio.) ^a	13,8 (\pm 2,4)	3,3 (\pm 0,7)	3,5 (\pm 0,6)
Ansiedlungseffizienz (in %) ^{a,b}	11,4 (\pm 1,8)	3,1 (\pm 0,6)	3,2 (\pm 0,5)

Tab. 5: Quantifizierung Karbon-markierter KCs in der Leber des Empfängers nach KC-Injektion.

^a Die Berechnung beruht auf einer Karbon-Markierungsrate der KCs von 70 %.

^b Die Berechnung basiert auf der Formel: Anzahl der Karbon-markierten KCs in der Empfängerleber / (Anzahl der Karbon-markierten KCs in der Empfängerleber + Anzahl der Karbon-markierten KCs in der Spenderleber).

Die um den Faktor 4 höhere Ansiedlung von transplantierten KCs in die Lebermatrix durch eine Cyclosporin A Vorbehandlung deutet u.a. darauf hin, dass die Neuan-siedlung durch die Immunantwort des Empfängers stark limitiert wird. Die niedrigeren Ansiedlungs-raten der Gadoliniumchlorid- bzw. der Kombinationsgruppe lassen sich mit restlichen, somit noch nicht eliminierten Gadoliniumchlorid erklären, womit nicht nur die residualen sondern auch zahlreiche Spender-KCs depletiert wurden. Die Daten der KC-Repopulation und Ansiedlungseffizienz der beiden Gruppen korrelier-ten hierbei mit denen von Tieren, die eine Trägerlösung als Vorbehandlung vor der KC-Transplantation erhielten (Daten nicht gezeigt). Weiterhin konnte ein spezifi-sches, intrahepatisches Verteilungsmuster der transplantierten KCs in den Empfän-gerlebern nicht nachgewiesen werden.

5.2.2 Integration transplantierter Kupffer-Zellen außerhalb des Zielgewebes

Zusätzlich zum Zielgewebe wurde die Integration Karbon-markierter KCs in anderen Organen des Empfängers untersucht (Abb.23).

Zum Vergleich wurde erneut entsprechendes Gewebe von Tieren, denen entweder eine Karbonsuspension direkt oder eine Trägerlösung appliziert wurde, verwendet.

Nach Transplantation von Karbon-markierten KCs konnte lediglich im Milzgewebe des Empfängers vereinzelt (am ehesten ungebundenes) Karbon nachgewiesen wer-den. Durch eine Empfängervorbehandlung mit Gadoliniumchlorid oder Cyclosporin A und Gadoliniumchlorid stieg der Karbon-Nachweis im Milzgewebe im Vergleich zu mit Cyclosporin A alleine vorbehandelten Empfängern. Unter Berücksichtigung nachfolgend erhobener Daten, die eine Transgenexpression adenoviral transduzier-ter und in der Folge transplantierter KCs nur im Empfängerlebergewebe zeigte, ist der positive Nachweis von Karbon im Milzgewebe des Empfängers, nach erfolgter KC-Transplantation, hierbei allerdings nur auf einen stattgehabten Abbau der trans-plantierten KCs zurückzuführen. Die vorliegenden Ergebnisse lassen somit auf keinen funktionellen Einbau transplantierter KCs außerhalb des Zielgewebes schließen.

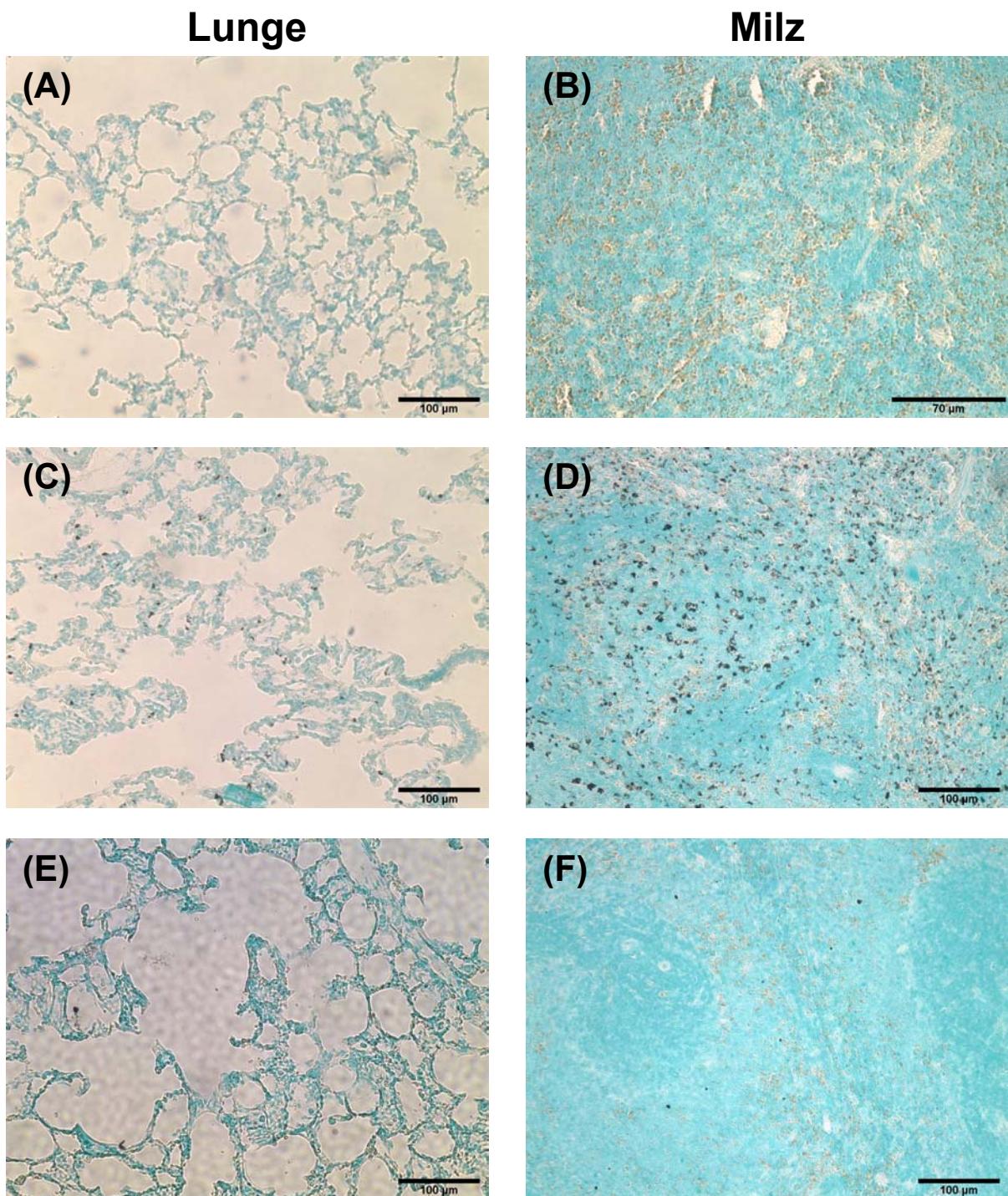


Abb. 23: Lokalisation von Karbon im Lungen- und Milzgewebe des Empfängers nach KC-Transplantation. Unbehandeltes Gewebe (0,9-%ige NaCl-Lösung, Negativ-Kontrolle): (A) Lunge, (B) Milz. Gewebe nach direkter systemischer Karboninjektion (Positiv-Kontrolle): (C) Lunge, (D) Milz. Gewebe nach Transplantation Karbon-markierter KCs: (E) Lunge, (F) Milz. (Repräsentative Histologie, Vergrößerungsfaktor 200 x).

5.2.3 Generelle Auswirkung der Transplantation von Kupffer-Zellen auf den Empfänger

Ein weiterer, wichtiger Aspekt der durchgeführten Experimente war, ob die Integration von Spender-KCs in das Zielgewebe eine generelle (ggf. inflammatorische) Auswirkung auf den Empfänger bzw. die Leber hat und ob sich hierbei Unterschiede bezüglich der verschiedenen Vorbehandlungen der Empfängertiere zeigen. Hierzu wurde aus den Empfängertieren Vollblut über eine Schwanzvene bzw. die Vena cava inferior zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h, 8 h, 24 h) nach KC-Transplantation gewonnen. Nach Zentrifugation wurde das Serum abgenommen und mögliche Belastungen der Empfängertiere u.a. durch die Messung der Lebertransaminasen (Aspartat Aminotransferase, AST = GOT; Alanin Aminotransferase, ALT = GPT) untersucht. Während des gesamten Versuchverlaufs zeigten die Ergebnisse hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen den KC-transplantierten Tieren sowie den Positiv- und Negativ-Kontrollen (Abb. 24, GOT-Werte nicht aufgeführt, da gleichverlaufend). Bezüglich des Vergleichs der unterschiedlichen Empfängervorbehandlungen fanden sich lediglich 24 h nach KC-Transplantation signifikante Unterschiede der Transaminasen zwischen Tieren, die mit Cyclosporin A bzw. der Kombinationsgruppe vorbehandelt wurden mit der Gruppe, denen Gadoliniumchlorid alleine verabreicht wurde, was auf eine prinzipielle Verminderung der KCs im Empfänger durch die generelle KC-Depletion zurückzuführen ist (Abb. 25, GOT-Werte nicht aufgeführt, da gleichverlaufend).

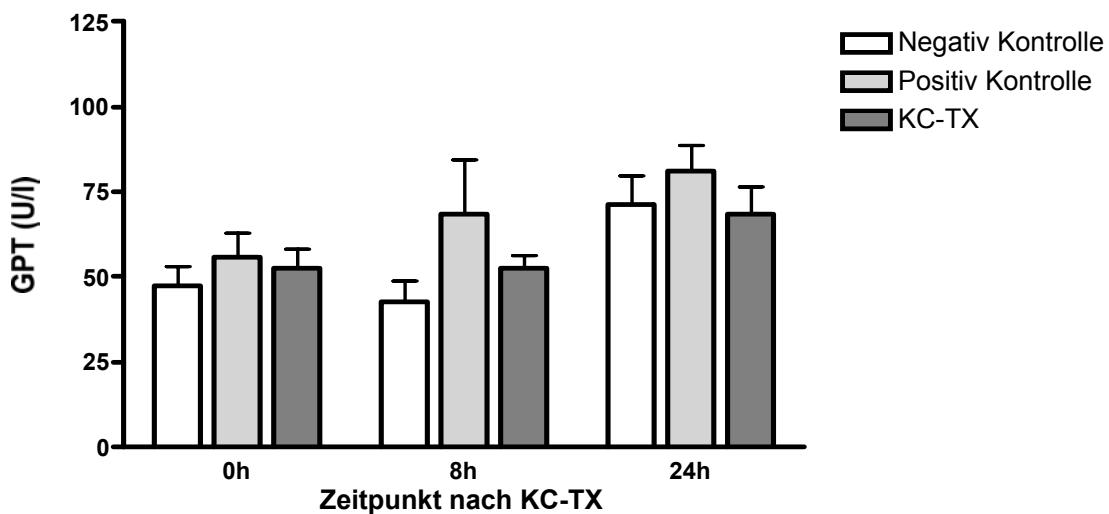


Abb. 24: Generelle Auswirkung der Transplantation von KCs auf den Empfänger. GPT-Werte von unbehandelten Tieren (0,9-%ige NaCl-Lösung, Negativ-Kontrolle), Tieren nach direkter systemischer Karboninjektion (Positiv-Kontrolle) sowie Tieren nach Transplantation Karbon-markierter KCs (KC-TX) (n = 4, Darstellung als Mittelwerte ± Standardabweichung).

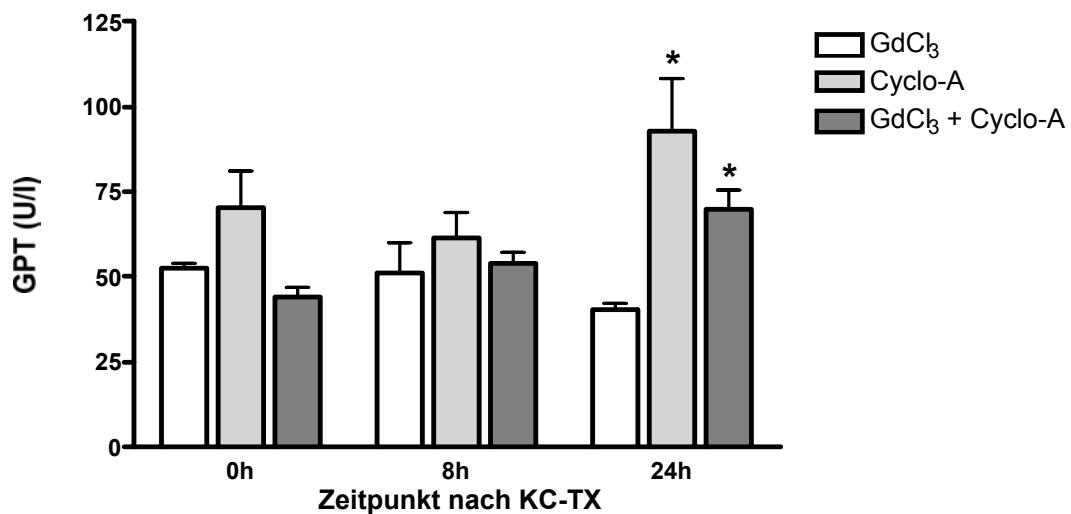


Abb. 25: Auswirkung der Transplantation von KCs auf den Empfänger bei unterschiedlicher Empfängervorbehandlung. GPT-Werte des Empfängers nach Transplantation Karbon-markierter KCs bei Empfängervorbehandlung mit Cyclosporin A (Cyclo), Gadoliniumchlorid (GdCl₃) oder Cyclosporin A + Gadoliniumchlorid (Cyclo + GdCl₃) (n = 4, Darstellung als Mittelwerte ± Standardabweichung, *p < 0,05 bezogen auf die 24 h-Werte der Gadoliniumchloridgruppe).

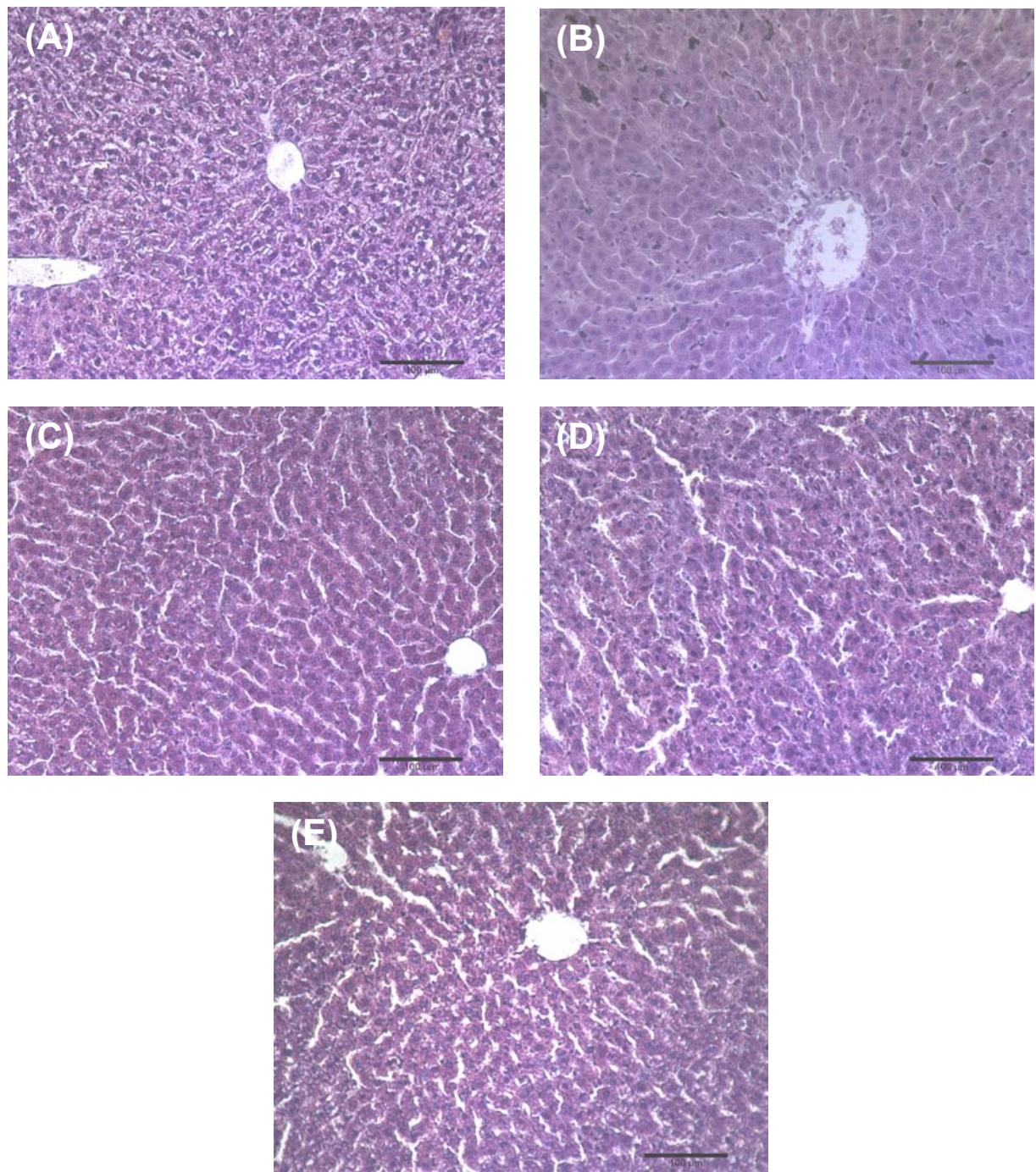


Abb. 26: Auswirkungen der Transplantation von KCs auf das Lebergewebe des Empfängers bei unterschiedlichen Vorbehandlungen des Empfängers. HE-Färbung bei (A) unbehandeltem Lebergewebe (0,9-%ige NaCl-Lösung, Negativ-Kontrolle), (B) Lebergewebe nach direkter systemischer Karboninjektion (Positiv-Kontrolle), Lebergewebe von Reinkjectionstieren nach Vorbehandlung mit (C) Cyclosporin A, (D) Gadoliniumchlorid oder (E) Cyclosporin A + Gadoliniumchlorid. (Repräsentative Histologie, Vergrößerung 400 x).

Die histologische Auswertung des Lebergewebes (HE-Färbung) zur Evaluation der Leberpathologie zeigte nach KC-Transplantation sowohl im Vergleich zu den Kontrollgruppen als auch im direkten Vergleich der unterschiedlich vorbehandelten Empfängergruppen keine wesentlichen Auffälligkeiten bzw. Veränderungen. Spezifische histologische Entzündungszeichen (z.B. Infiltration entsprechender Entzündungszellen oder nekrotisches Gewebe) konnten nicht nachgewiesen werden (Abb. 26). Die Ergebnisse führen somit zu der Schlussfolgerung, dass die Transplantation und Repopulation von KCs für sich alleine keine signifikanten Auswirkungen auf den Empfänger hat.

5.3 Veränderung des Genexpressionsmusters in humanen Kupffer-Zellen bei Fibrose/Zirrhose

5.3.1 Globales mRNA-Expressionsprofil eines Zirrhose-Patienten im Vergleich zu einem Kontrollpatienten

In dieser Untersuchung wurde unter Verwendung von DNA-Microarrays eine genomweite Expressionsanalyse von Kupffer-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden KCs aus einem Leberresektat eines Zirrhose- (Child C, Diagnose: sekundär sklerosierende Cholangitis) und eines Kontrollpatienten (Diagnose: Lebermetastase eines Rektumkarzinoms), jeweils die Total-RNA gewonnen und deren Expressionsprofile mit dem Affymetrix HG U133 Plus 2,0 Genchip analysiert (Abb. 27).

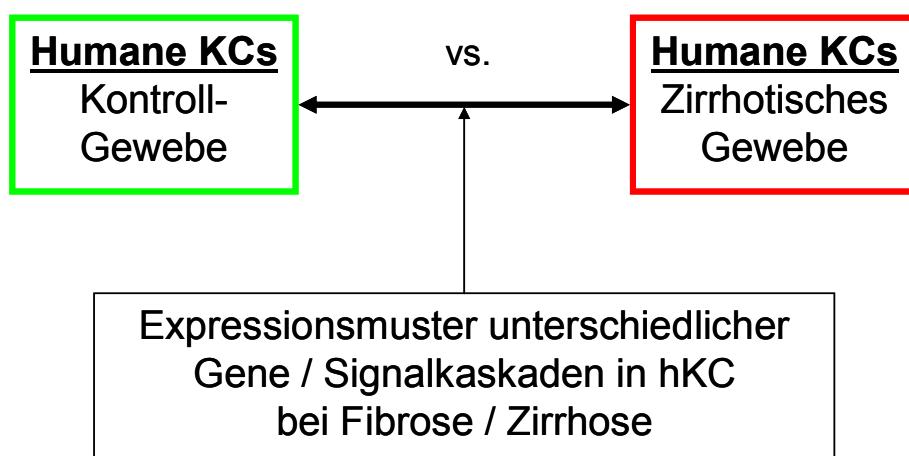


Abb. 27: Versuchsaufbau der DNA-Microarray Analyse.

Von dem Kontrollpatienten wurde für die Isolation nur Gewebe verwendet, welches aus dem Resektionsrand stammte und durch 2 Pathologen als nicht tumorartig eingestuft wurde. Tabelle 6 und 7 gibt diesbezüglich einen allgemeinen Überblick über die Unterschiede in der Regulation der KC-Gene zwischen den beiden Probanden.

	Anzahl an Genen	in % aller Gene	Anzahl an regulierten Genen in %
Anzahl Increased	4263	7,8 %	45,83 %
Anzahl Decreased	4513	8,3 %	48,52 %
Anzahl MIncreased	222	0,4 %	2,39 %
Anzahl MDecreased	303	0,6 %	3,26 %
Anzahl No Change	45374	83,0 %	
Anzahl Regulated	9301		

Tabelle 6: Biostatistische Auswertung der KC-Genexpressionsanalyse mittels DNA-Microarray.
Dargestellt ist die Anzahl an hoch- und runterregulierten Genen der KC-Population der Leber des Zirrhosepatienten verglichen mit den KCs der Kontrollleber, deren Prozentwert bezogen auf alle Gene und der Prozentsatz bezogen auf die Anzahl an regulierten Genen.

Regulation zur Basis 2:	$0 \leq \text{Reg.} < 1$ bzw. $0 \geq \text{Reg.} > -1$	$\text{Reg.} \geq 1$ bzw. $\text{Reg.} \leq -1$	$\text{Reg.} \geq 2$ bzw. $\text{Reg.} \leq -2$	$\text{Reg.} \geq 3$ bzw. $\text{Reg.} \leq -3$	$\text{Reg.} \geq 4$ bzw. $\text{Reg.} \leq -4$
Anzahl increased	2239	2245	821	343	125
Anzahl decreased	3237	1578	314	110	25

Tabelle 7: Biostatistische Auswertung der KC-Genexpressionsanalyse mittels DNA-Microarray.
Die Anzahl der Genregulationen der KC-Population der Leber des Zirrhosepatienten verglichen mit den KCs der Kontrollleber ist mit deren Regulationshöhen zur Basis 2 (Wert = $2^{\text{Reg.}}$) weiter aufgeschlüsselt.

Bei den KCs des Leberzirrhosepatienten zeigten 17,0 % Gene eine differentielle Regulation (Tab. 6) in der Makrophagenpopulation des Organs verglichen mit dem Kontrollpatienten. Im Detail waren bei den KCs des Patienten mit der Diagnose

Leberzirrhose 7,8 % der Gene (45,83 % aller regulierten Gene) spezifisch hoch- und 8,3 % der Gene (48,52 % aller regulierten Gene) spezifisch runterreguliert. Die vorliegende Auswertung stellt allerdings nur eine grobe Übersicht dar. Sie verdeutlicht aber die Vielzahl an komplexen Vorgängen bei den pathologischen Veränderungen von einer gesunden hin zu einer zirrhotischen Leber.

5.3.2 Pathway-bezogene Auswertung der DNA-Microarray Ergebnisse

Für eine detailliertere Analyse wurden die DNA-Microarray Daten im nächsten Schritt einer biomedizinischen Pathway Analyse unterzogen. Die Untersuchung erfolgte in Kooperation mit PD. Dr. Thomas Langmann vom Institut für Klinische Chemie des Klinikums der Universität Regensburg. Die Methode wurde an diesem Institut etabliert und stellt eine Eingruppierung aller bisher bekannten humanen Gene in biomedizinische Kategorien dar. Diese, auch als Synopsis bezeichnete Genlistensammlung, umfasst 77 Hauptkategorien, die sich in über 500 Subkategorien aufgliedern. Insgesamt enthält sie 32451 Einträge, wobei aber auch Gene mehr als einmal, dann jedoch nur in unterschiedlichen Kategorien, vorkommen können. Die thematische Klassifizierung erfolgte dabei nach verschiedenen Punkten wie z.B. Zugehörigkeit zu metabolischen bzw. biochemischen Prozessen, zu Gengruppen bzw. Genfamilien, zu Signalkaskaden, zu Zielgenen von Transkriptionsfaktoren oder zu Organellen. Darauf lassen sich universell sowohl hochdichte Affymetrix DNA-Microarray Daten, als auch Expressionswerte von *customized*, niedrig dichten Microarrays abbilden, was eine Identifizierung von besonders betroffenen Kategorien erlaubt. Weiterhin können so koordiniert regulierte Gengruppen bzw. regulatorische Netzwerke gefunden werden.

Tabelle 8 zeigt die Zusammenfassung der Pathway-bezogenen Analyse der DNA-Microarrays. Bei dem Vergleich der Genexpression von KCs in der Zirrhoseleber mit denen in der Kontrollleber sind für jede der untersuchten 77 Kategorien sowohl die absolute Zahl als auch der Prozentwert der regulierten Gene, bezogen auf die Anzahl der jeweils auf den DNA-Microarrays repräsentierten Gene, angegeben. Bei der Interpretation wurde nach hohen Prozentzahlen gesucht, die besonders betroffene Kategorien anzeigen. Traten allerdings in Kategorien mit insgesamt nur wenigen Einträgen unterschiedlich regulierte Gene auf, ergaben sich automatisch hohe Prozentzahlen, die kritisch betrachtet wurden. Auf der anderen Seite wurde auch die

absolute Zahl an differentiell regulierten Genen betrachtet, um betroffene Kategorien zu identifizieren, da sich aus einer großen Anzahl an Einträgen nur niedrige Prozentzahlen ergaben. Auffallend bei dieser Auswertung war die Hochregulation von Kategorien (rot markiert), die insbesondere bei der Aktivierung von KCs eine Rolle spielen. So zeigte sich u.a. eine gehäufte differentielle Hochregulation in den Kategorien 4-8. Darin enthalten sind Gene wie z.B. Zytokine, Chemokine, der NF κ B-Signalkaskadeweg oder Interferon γ -regulierte Gene. Aktivierte KCs exprimieren bzw. fördern die Produktion physiologisch aktiver Substanzen wie Eicosanoiden, inflammatorischen Zytokinen (u.a. IL 1, IL 6, TNF α), Wachstumsfaktoren (z.B. TGF β , PDGF), lysosomalen Enzymen, freien Radikalen oder Prostaglandinen (u.a. Kategorien 23, 24, 42). Diese Substanzen haben wiederum Auswirkung auf metabolische Vorgänge in anderen Zellen (u.a. Hepatozyten, Ito-Zellen, Endothelzellen), wobei sie in ihnen verschiedene Vorgänge bzw. Veränderungen wie die Synthese von Akut-Phase-Proteinen, Glukose-Produktion, Vasokonstriktion, Apoptose, Zellproliferation oder generalisiert Gewebeschädigung induzieren (118-123). Die vorliegenden Ergebnisse weisen somit auf eine entsprechende Beteiligung von aktivierten KCs beim Krankheitsbild der Leberzirrhose hin.

	Pathway	on chip	KCs Zirrhose vs. Kontrolle			
			I, MI	Proz.	D, MD	Proz.
1	WNT	224	34	15,2%	22	9,8%
2	Notch	735	151	20,5%	97	13,2%
3	CD genes / CD13 / Ezetrol pathway	1192	312	26,2%	178	14,9%
4	CD14 / TLRs / SCRs / Complement-System / Defensins / Granzymes	947	241	25,4%	158	16,7%
5	Phagosome / Annexins / Connexins / Copins	603	149	24,7%	109	18,1%
6	IL-1b / Cytokines / Chemokines / Poetins	100	26	26,0%	9	9,0%
7	NFKB signalling / NFKB target genes	85	23	27,1%	10	11,8%
8	IFNg regulated genes	213	67	31,5%	41	19,2%
9	Thrombosis / Haemostasis / Homocysteine	73	15	20,5%	41	56,2%
10	ABC transporter / Walker motif family / ATPases	130	21	16,2%	28	21,5%
11	ABC A1/ABC A7/NPC/Cav associated	444	106	23,9%	72	16,2%
12	Ion channels / Porins / solute carriers	535	53	9,9%	85	15,9%
13	Vesicular trafficking / lipid droplet / Raft Proteomics	1143	257	22,5%	195	17,1%
14	Lysosome / CLNs / START	52	10	19,2%	11	21,2%
15	pH Regulation / Epidermis	715	130	18,2%	149	20,8%
16	Amino Acid transport / metabolism	0	0	0,0%	0	0,0%
17	Rab/Ras Family	233	42	18,0%	27	11,6%
18	Rac/CDC42 regulatory pathways	41	6	14,6%	6	14,6%
19	Lamellar body / GPI-anchored / Golgi	601	136	22,6%	66	11,0%
20	Adapter proteins / PDZ family / Domain proteins / coiled coil	1030	159	15,4%	143	13,9%
21	Cytoskeleton / Actin / Tubulin / Myosin / Spectrin / Migration / polarization	315	48	15,2%	36	11,4%
22	Purin and Pyrimidin metabolism / FAD / NAD / Nucleotide / Nucleoside	979	159	16,2%	157	16,0%
23	TNF receptor signalling	166	36	21,7%	23	13,9%
24	TNF/Pi3 kinase coupling	39	12	30,8%	2	5,1%
25	Apoptosis / Proteasome / Heat shock	791	103	13,0%	129	16,3%
26	Mitochondrion / Peroxisome	393	18	4,6%	146	37,2%
27	Insulin / Glucose / Glutathione / Glucuronides / Energy / b-Oxidation / Fucose	414	41	9,9%	127	30,7%
28	Detoxification: Phase I / Cytochromes	140	18	12,9%	55	39,3%
29	Detoxification: Phase II	86	7	8,1%	26	30,2%
30	NO / Thioredoxin / Metallothioneins / Selenoproteins	286	37	12,9%	74	25,9%
31	Fatty acid metabolism / Retionids / S100	291	36	12,4%	92	31,6%
32	Glycerocephospholipids	15	4	26,7%	1	6,7%
33	Phosphatidylinositol an Ca++ metabolism / GPI-anchored receptors / GPI biosynthesis	259	42	16,2%	34	13,1%
34	Sphingolipids	21	6	28,6%	3	14,3%
35	Gangliosides	49	9	18,4%	4	8,2%
36	Sulfatides / Cholesterol sulfate	31	2	6,5%	4	12,9%
37	Thyroid Hormone Metabolism	274	60	21,9%	69	25,2%
38	Cholesterol sterol metabolism / SREBP1/2 /bile acid / Cholesterol sulphate / Sulfatides	103	11	10,7%	24	23,3%
39	Glycosylation / Sialation / CTP / UTP / GTP / ITP	264	36	13,6%	55	20,8%
40	Proteinases / Serpins / MMPs / ADAMS / Kalikreins / Calpains / Cystostatins	268	47	17,5%	28	10,4%
41	Integrins	33	10	30,3%	3	9,1%
42	TGFbeta family / BMP / TGFb / Activins / Inhibins and signaling	202	55	27,2%	21	10,4%
43	Collagens	99	16	16,2%	9	9,1%
44	Laminin	34	11	32,4%	2	5,9%
45	Proteoglycans / Mucins / Defensins / Trefoils / IgA	108	12	11,1%	10	9,3%
46	Hyaluronan	102	25	24,5%	14	13,7%
47	Elastin / Fibrillin / Keratin / Fibulin	148	18	12,2%	12	8,1%
48	Junctional control	149	23	15,4%	6	4,0%
49	other ECM proteins	118	26	22,0%	14	11,9%
50	EGF-signaling	135	31	23,0%	17	12,6%
51	G protein receptors and G proteins	516	69	13,4%	35	6,8%
52	Kinases / Phosphatases	668	92	13,8%	103	15,4%
53	ZNF TCFs	477	30	6,3%	81	17,0%
54	ZNF202 target genes and coregulators	27	3	11,1%	12	44,4%
55	PPAR/LxR/Pxr/RxR/FxR nuclear receptor target genes	953	247	25,9%	268	28,1%
56	HNF1a / CDX2 / GATAA / HIF1a / RORa (potential) target genes	1021	144	14,1%	250	24,5%
57	Nuclear receptors	51	8	15,7%	15	29,4%
58	Homeobox	76	2	2,6%	1	1,3%
59	other specific transcription factors	375	64	17,1%	61	16,3%
60	USF1 target genes	67	11	16,4%	12	17,9%
61	Sphingolipid/Glycerol-PL-Transcription Factors	98	28	28,6%	14	14,3%
62	POLII / TAFs / CDK / Cyclins / CDCs / CDT-kinases in transcriptional control	264	25	9,5%	43	16,3%
63	Nucleosome / Nuclear matrix	115	2	1,7%	21	18,3%
64	RNA-Polymerases I and III	21	2	9,5%	6	28,6%
65	Splicing	64	7	10,9%	12	18,8%
66	Translation machinery / tRNA	358	40	11,2%	75	20,9%
67	Replikation	128	4	3,1%	20	15,6%
68	Skin disease loci / Atopic dermatitis / IgE / Lamellar Ichthyosis / Psoriasis / Netherton syndrome	4018	511	12,7%	640	15,9%
69	Connective tissue disease	205	44	21,5%	34	16,6%
70	IBD candidate loci	960	113	11,8%	135	14,1%
71	Colon expressed genes	1697	393	23,2%	259	15,3%
72	Vascular disease, Metabolic and Neurodegenerative diseases	6793	768	11,3%	1096	16,1%
73	Lipid sensitive genes in C. elegans	264	38	14,4%	55	20,8%
74	Placenta / Prostate / Sperm / Testes	227	46	20,3%	25	11,0%
75	Muscle Cell Metabolism	2320	505	21,8%	344	14,8%
76	not yet classified to pathways	3087	272	8,8%	467	15,1%
77	unknowns	5778	289	5,0%	558	9,7%
Summe		46036	6654		7286	

Tabelle 8: Pathway-bezogene Auswertung der KC-Genexpressionsanalyse mittels DNA-Microarray. Für jede der 77 Hauptkategorien (Pathway) ist die Zahl der hoch- (I,MI) und runterregulierten (D,MD) Gene dargestellt. Zusätzlich ist der Prozentwert, bezogen auf die jeweilige Zahl der auf den DNA-Microarrays repräsentierten Gene (on chip), angegeben. Besonders betroffene Kategorien, die bei der Aktivierung von KCs eine Rolle spielen sind rot hervorgehoben.

Ein weiterer Aspekt bei der Analyse des Genchips war nach Gegenregulationen von KCs zu suchen, die einen potentiell protektiven Effekt auf verschiedene Leberschädigungen bewirken können. Trotz der Vielfalt möglicher Noxen ist bei noch intakter Leberfunktion die Wiederherstellung der Organhomöostase mit Defektheilung das primäre Ziel. Hierfür wurde der Chip mittels David Software (siehe Material und Methoden) ausgewertet, wobei insbesondere alle KC-spezifischen Gene betrachtet wurden, die mindestens um den Faktor 2 reguliert waren. Bei dieser fokussierten Auswertung fielen im Vergleich der KCs der zirrhotischen Leber mit denen der Kontrollleber u.a. vermehrte Veränderungen im Sinne einer erhöhten Genexpression im IL 10-Pathway auf (Abb. 28, Tab 9).

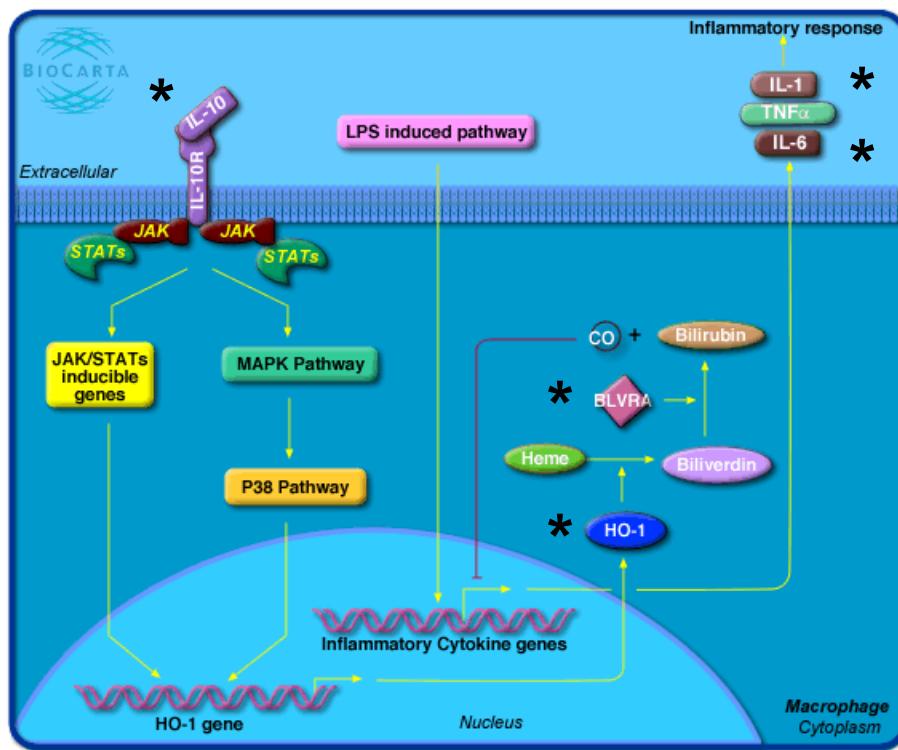


Abb. 28: Übersicht der Veränderungen des IL 10-Signalkaskadeweg in KCs aus zirrhotischem Lebergewebe. Die Gene, die im Vergleich zu denen aus KCs eines Leber-Kontrollgewebes mindestens um den Faktor 2 reguliert wurden, sind durch einen Stern gekennzeichnet. (Quelle: www.biocarta.com).

Dies ist insofern von erhöhtem Interesse, da IL 10 als anti-inflammatorisches Zytokin gilt und u.a. die Zytokinfreisetzung von Makrophagen, insbesondere die Sekretion von IL 1, IL 6, TNF α und IL 12, unterdrückt. Hierbei ist, wie bereits beschrieben, auch die Induktion des Enzyms Hämoxigenase 1 beteiligt. HO 1 katalysiert den geschwin-

digkeitsbestimmenden Schritt des Abbaus von Häm in Biliverdin, welches durch die Biliverdinreduktase weiter in freies Eisen (bzw. Ferritin) und CO umgewandelt wird. Neuere Untersuchungen belegen, dass CO die anti-inflammatoryischen Eigenschaften von HO 1 mitbestimmt, da ein Entzug von CO auch die entzündungshemmenden Effekte von IL 10 abschwächt. Der inhibitorische Effekt von IL 10 auf die IL 1-, IL 6- und TNF α -Produktion ist entscheidend für die anti-inflammatoryischen Eigenschaften des Zytokins, da diese Substanzen häufig synergistische Effekte auf verschiedene entzündliche Prozesse besitzen, indem sie die körpereigene Antwort durch sekundäre Mediatoren wie Chemokine, Prostaglandine und PAF verstärken (86). Tabelle 9 zeigt Veränderungen der Expressionswerte von Genen des IL 10-Signalkaskadewegs in der KC-Population der Zirrhose- verglichen mit derjenigen der Kontrolleber.

Gen	Regulation
IL 10	2,6 ↑
Hämoxigenase 1	3,7 ↑
Biliverdinreduktase	2,1 ↑
IL 1a	10,6 ↑
IL 1b	1,7 ↑
IL 6	9,2 ↑
TNF α induced protein 6	18,4 ↑

Tab. 9: DNA-Microarray Ergebnisse der Expression ausgewählter Gene im Vergleich von KCs aus zirrhotischem Lebergewebe mit KCs aus Kontrollgewebe. Expressionsmuster ausgewählter Gene des IL 10-Signalkaskadewegs beim Vergleich der KCs aus dem zirrhotischen Lebergewebe mit der Makrophagenpopulation aus dem Lebergewebe des Kontrollpatienten.

Die Hochregulation des anti-inflammatoryischen Zytokins IL 10, und daraus resultierend die Induktion von Hämoxigenase 1 und Biliverdinreduktase, verdeutlicht, dass in dem Krankheitsbild der Leberzirrhose offensichtlich eine gewisse Gegenregulation im Körper zu entzündlichen Prozessen stattfindet. Die Ergebnisse des Microarrays zeigen aber auch auf, dass bei der Pathologie der Leberzirrhose insgesamt die Entzündungsmediatoren überwiegen.

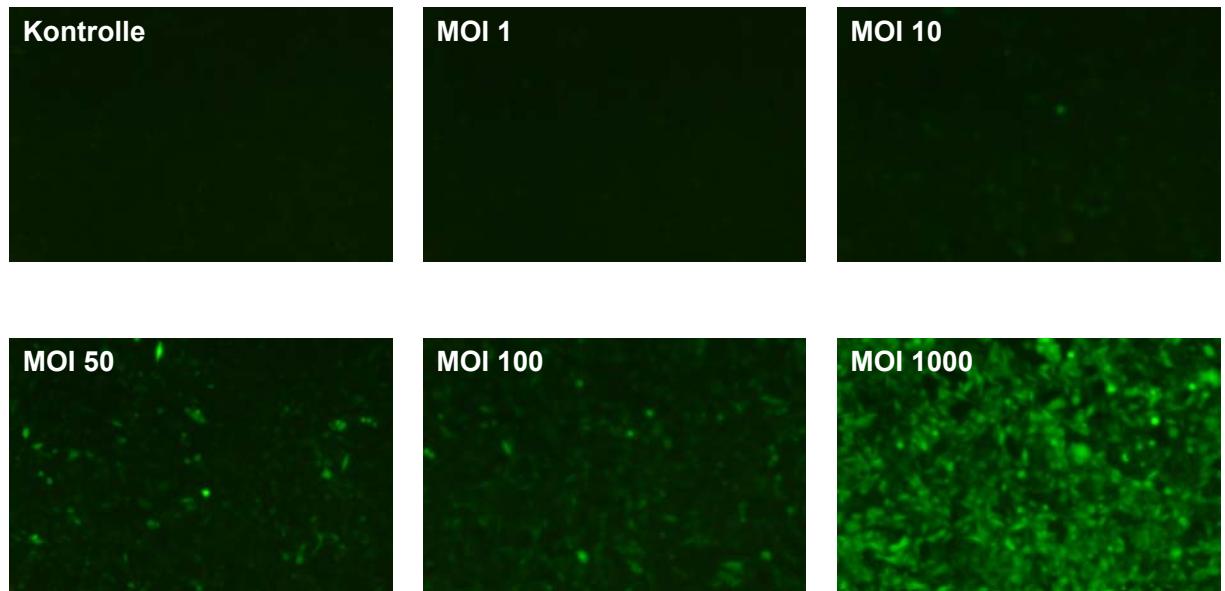
5.4 Transplantation von Ratten-Kupffer-Zellen (speziell)

5.4.1 *In vitro* Transduktion von Kupffer-Zellen

Basierend auf dem bisherigen Erkenntnisstand, sollte zunächst geklärt werden, ob KCs mit entsprechenden adenoviralen Vektoren transduziert werden und im Verlauf, nach erfolgter KC-Transplantation, die Expression des spezifischen Transgens in der Empfängerleber nachgewiesen werden kann (humanes IL 10 als „therapeutisches Gen“ bzw. EGFP als Reportergen). Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass Adenoviren unterschiedliche Zelltypen (inkl. Makrophagen) infizieren und daraus resultierend die Expression von funktionellen Transgenen induzieren können (73; 124-126). Die Transduktion durch Adenoviren ist ein Rezeptor-vermittelter Vorgang, welcher neben dem Coxsackieadenovirus-Rezeptor das alpha V beta 5- ($\alpha V\beta 5$ -) Integrin, das als Co-Rezeptor agiert, einschließt (127). So konnte für KCs bereits demonstriert werden, dass sie das $\alpha V\beta 5$ -Integrin exprimieren und dass die adenovirale Transduktion der Zellen als $\alpha V\beta 5$ -Integrin-abhängiger Mechanismus erfolgt (125).

Die verwendeten Virusstocks wurden wie im Methodenteil beschrieben vermehrt und die Virustiter bestimmt. Zur Überprüfung der Methode wurde zunächst die Transduktionsfähigkeit des Reporter-Konstrukts Ad5.EGFP an HepG2-Zellen, einer Hepatomzelllinie getestet. Dafür wurden auf eine Million Zellen für 24 h Virusverdünnungen in steigender Konzentration (MOI: 0, 1, 10, 50, 100, 1000) gegeben, anschließend das Medium gewechselt und nach weiteren 2 Tagen der Shift im FITC-Kanal des FACS analysiert (Abb. 29), da sich nach ca. 72 h das Maximum der Transgen-Expression einstellt (73; 125; 126).

(A)

Fluoreszenz

(B)

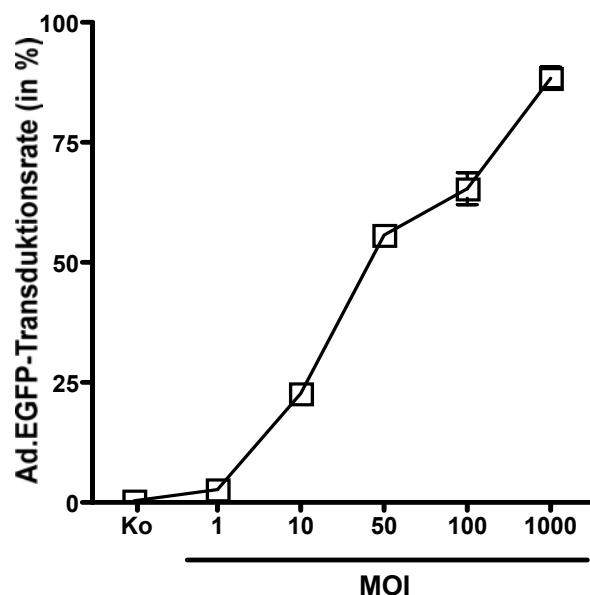
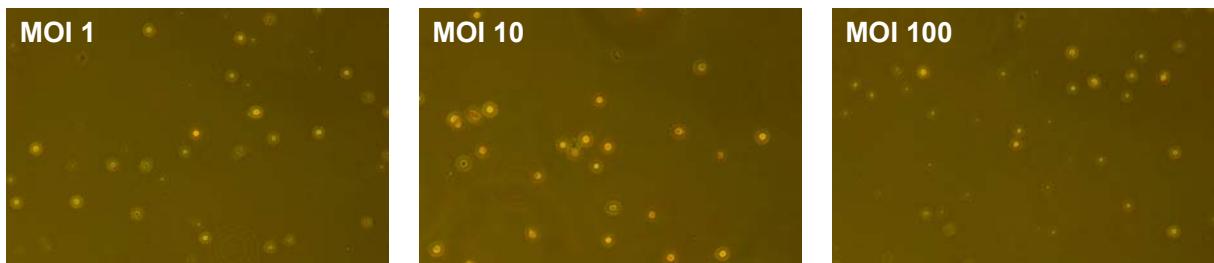


Abb. 29: Transduktion von HepG2-Zellen mit dem Kontrollvektor Ad5.EGFP. Die Hepatomzelllinie HepG2 wurde für 24 h mit dem Adenovektor Ad5.EGFP mit einer MOI von bis zu 1000 transduziert. 3 Tage nach der Infektion wurde die Transduktion der HepG2-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft (A) und die entsprechenden Transduktionsraten der Zellen zusätzlich mittels FACS-Analyse (B) quantitativ bestimmt. Die Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardfehler ($n = 5$).

Bei einer MOI von 1000 lag nach 3 Tagen die Transduktionsrate der HepG2-Zellen bei rund 90 %, einer Quote, welche die Funktionalität der Methode beweist. In einem nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob durch rekombinante Adenoviren transduzierte KCs ebenfalls das spezifische Genprodukt exprimieren. Hierfür wurde für Ad5.EGFP der analoge Versuchsansatz auf KCs übertragen. Die Transduktionsraten der KCs wurden nach 3 Tagen mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet (Abb. 30). Zur Quantifizierung wurde dabei die Anzahl infizierter (= fluoreszierender) Zellen von mindestens 5 verschiedenen Gesichtsfeldern ausgezählt und auf die Gesamtzahl der Zellen bezogen. Abbildung 30 gibt einen Überblick der Ergebnisse der Transduktionsraten von KCs nach einer Periode von 72 h und unterschiedlichen Virusverdünnungen. Bei einer MOI von 10 leuchteten 28,7 % ($\pm 21,4$ %) der KCs mit der typisch grünen Fluoreszenz, was für die Infektion der Zellen mit dem Reportergen EGFP spricht. Im Gegensatz zu den HepG2-Zellen konnte jedoch bei einer Erhöhung des Virustiters keine Steigerung der Transduktionsrate festgestellt werden. Ab einer 50-fach größeren Menge an Viruspartikeln verglichen mit der Zellzahl, reduziert sich die Zahl infizierter Zellen wieder auf ein Basisniveau von 2-3 %. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Lebermakrophagen als Primärzellen im Vergleich zu Zelllinien nur eingeschränkt transduzierbar sind, und lediglich in einem kleinen Fenster eine akzeptable, effiziente Transduktionsrate zeigen.

(A)

DurchlichtFluoreszenz

(B)

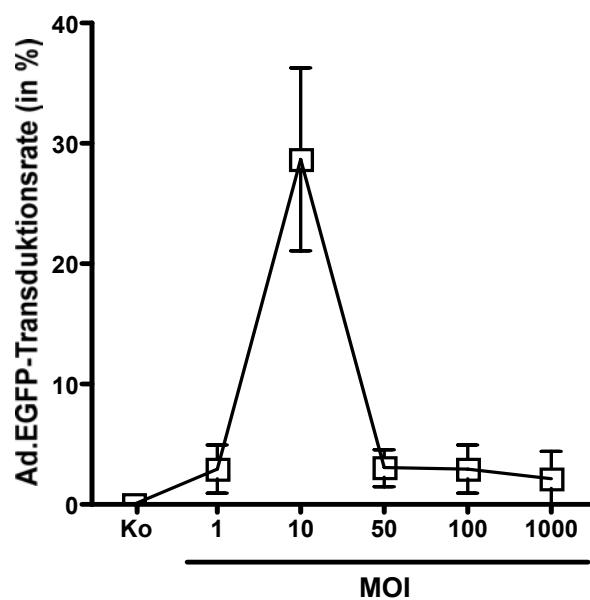


Abb. 30: Transduktion von Ratten-KCs mit dem Kontrollvektor Ad5.EGFP. Die initiale Infektionszeit betrug 24 h. Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der KCs ((A), Vergrößerung 200 x) 72 h nach Beginn der Infektion und die daraus resultierende quantitative Auswertung der Transduktionsrate (B). Die Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardfehler von mindestens 5 verschiedenen Gesichtsfeldern.

Nach den Voruntersuchungen mit dem Reporterkonstrukt Ad5.EGFP wurde nun die Infektionsfähigkeit der KCs mit dem hIL 10-Virusstock getestet. Die Versuchsbedingungen wurden dabei geringfügig verändert. Zu einer Million Zellen wurden hierbei Virustiter in steigender Konzentration (MOI 0, 0,1, 1, 10, 50, 100 und 1000) über einen Zeitraum von 24 h gegeben. Nach einem Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Die Expression des Transgens hIL 10 wurde nach weiteren 48 h durch Bestimmung der Zytokinkonzentration im Überstand der KC-Population mittels einem für hIL 10 spezifischen ELISA bestimmt (Abb. 31).

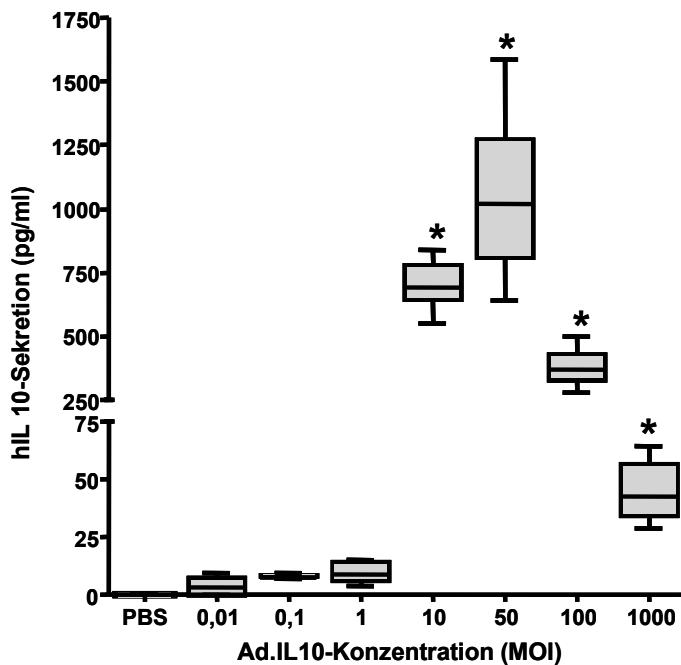


Abb. 31: hIL 10-Zytokinsekretion von Ratten-KCs nach einer optimalen Transduktionszeit von 72 h und unterschiedlicher Virustitrierung. Die initiale Infektionszeit betrug 24 h. Die Zytokine wurden nach 72 h im Überstand der Ratten-KCs mit einem für hIL 10 spezifischem ELISA gemessen (n = 6 pro Gruppe, *p < 0,05 bezogen auf die MOI-Werte von 0,01-1).

Die Kurve der IL 10-Spiegel in den Überständen besitzt hierbei einen prinzipiell ähnlichen Verlauf wie die Transduktionsrate der KCs mit Ad5.EGFP. Das Maximum der Transgenexpression liegt hier allerdings bei einer MOI von 50 mit einer Sekretion von etwa 1000 pg/ml, wobei wiederum, wie beim EGFP-Virus, durch eine höhere Viruskonzentration keine zusätzliche Steigerung der IL 10-Sekretion erwirkt werden konnte. Offensichtlich scheinen bei höheren Virusbelastungen zytotoxische Effekte einzutreten, die eine Steigerung der Transgenexpression reduzieren bzw. aufheben.

Bezüglich der möglichen Auswirkungen des adenoviralen Gentransfers (hier des Ad5.hIL 10-Viruses) auf die KCs wurden weiterhin 24 h nach Infektion die IL 6- und TNF α -Levels im Überstand der KC-Kulturen als Marker einer möglichen KC-Aktivierung bestimmt (Abb. 32).

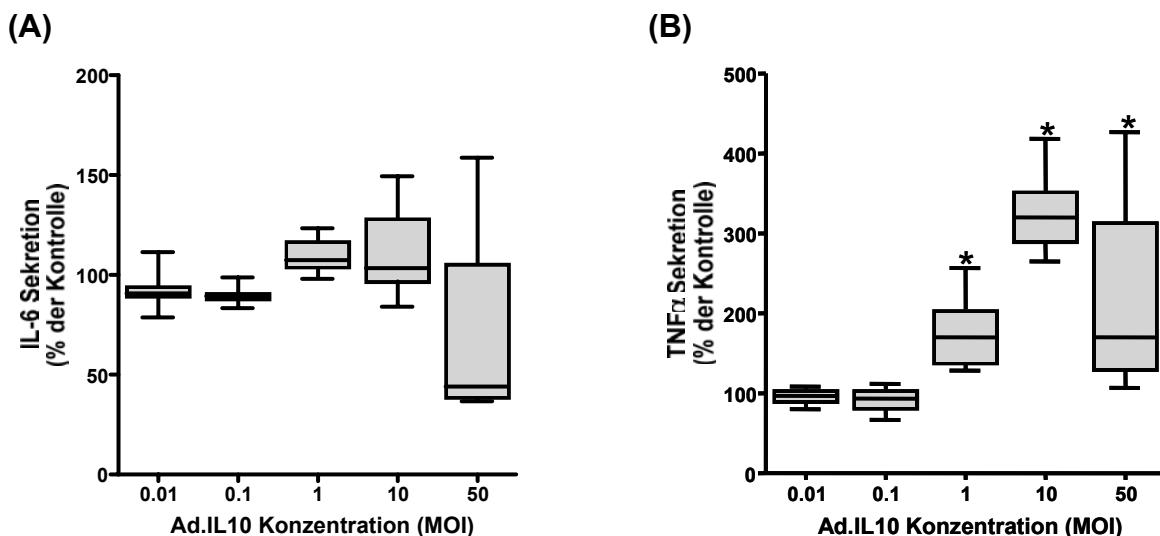


Abb. 32: Evaluation der Effekte des adenoviralen Gentransfers (hier Ad5.hIL 10) auf die KC-Population durch Messung der IL 6- (A) und TNF α - (B) Zytokinspiegel nach unterschiedlichen Virusbelastungen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden bei den 24 h TNF α -Werten ab einer MOI von 1 erhalten ($n = 6$ pro Gruppe, $*p < 0,05$ bezogen auf die Werte der PBS-Kontrollgruppe).

Die Virusbelastung mit Ad5.hIL 10 führte 24 h nach Beginn der Infektion zu keinen signifikanten Änderungen der IL 6-Level im Überstand der KCs. Ab einer MOI von 1 zeigten sich jedoch 24 h nach Beginn der Infektion signifikante Unterschiede der TNF α -Spiegel. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die adenovirale Transduktion zu einem gewissen Maß die Makrophagenpopulation aktiviert.

In einem letzten Schritt sollte nun die Fragestellung beantwortet werden, ob die Transduktion der KCs mit dem „therapeutischen Gen“ hIL 10 einen potentiell protektiven Effekt in einem Schädigungsmodell besitzt. Hierzu wurden wieder die KCs für 24 h mit dem Ad5.hIL 10-Virus infiziert. Nach dieser Periode erfolgten ein Mediumwechsel und die Stimulation der infizierten KCs für 24 h mit dem Endotoxin LPS (10 μ g/ml) bzw. PBS als Kontrolle. Zur Evaluation von Effekten wurden wiederum die IL 6- und TNF α -Spiegel im Überstand der KC-Kulturen betrachtet (Abb. 33).

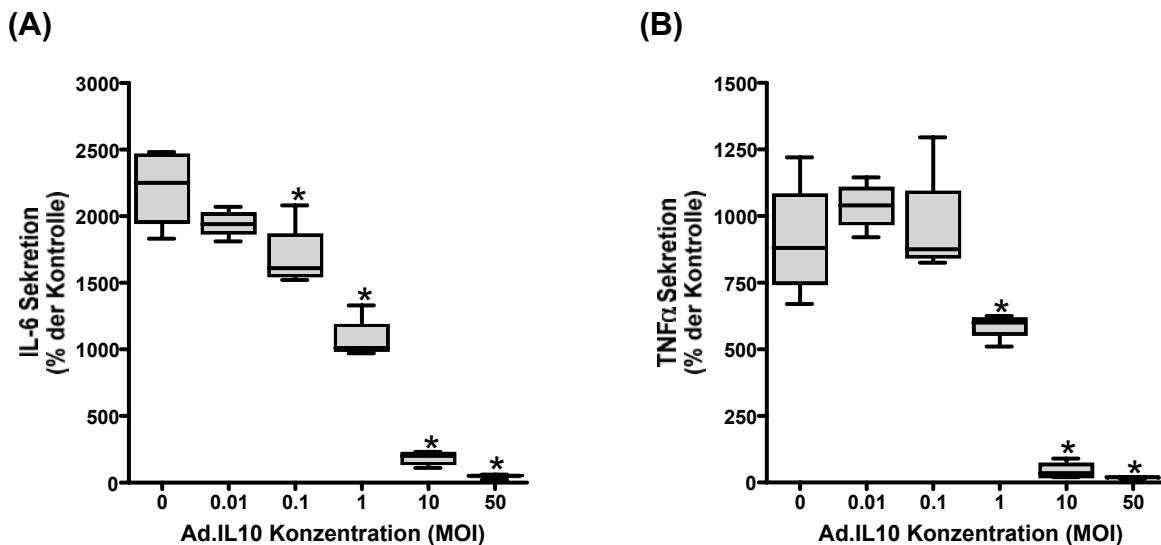


Abb. 33: Evaluation der Effekte von Ad5.hIL 10 auf die Makrophagenpopulation nach 24-stündiger Stimulation mit LPS (10 µg/ml) bzw. PBS als Kontrolle. Messung der Zytokinspiegel (A) IL 6, (B) TNF α) im Überstand der KCs bei unterschiedlichen Virusbelastungen. (n = 6 pro Gruppe, *p < 0,05 bezogen auf die Werte der PBS-Kontrollgruppe).

Abbildung 33 zeigt den Verlauf der IL 6- und TNF α -Konzentrationen der mit hIL 10-infizierten KCs nach Stimulation mit LPS. Bereits bei einer MOI von 0,1 wurden bei den IL 6-Spiegeln im Überstand der KCs eine signifikante Verminderung des pro-inflammatorischen Zytokins erhalten. Weiterhin fallen bis zu einer MOI von 50, was dem Maximum der Transgenexpression entspricht (siehe Abb. 31), die Konzentrationen beider Entzündungsmediatoren in dosisabhängiger Weise kontinuierlich ab. Diese inhibitorischen Effekte von hIL 10 auf die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wird über verschiedene Wege vermittelt (siehe Einleitung) und ist ein wesentlicher Faktor für die anti-inflammatoryen Eigenschaften dieses Zytokins. Die *in vitro* Voruntersuchungen verdeutlichen, dass die Überexpression von hIL 10 in der Leber einen protektiven Effekt bei verschiedenen Gewebeschädigungen vermitteln kann, da IL 6 und TNF α oft synergistische Effekte auf inflammatorische Signalkaskaden und Prozesse besitzen, wobei sie die Antwort durch Induktion von sekundären Mediatoren wie z.B. Chemokinen, Prostaglandinen und PAF verstärken können (86).

5.4.2 Transplantation von adenoviral transduzierten Ratten-Kupffer-Zellen

Aus den Daten des Repopulationsversuchs und der erfolgreichen *in vitro* Transduktion von KCs sollte in einem nächsten Schritt nun untersucht werden, ob durch rekombinante Adenoviren transduzierte KCs das spezifische Genprodukt weiter exprimieren, nachdem sie im Empfänger angesiedelt worden waren. Dies ist von besonderem Interesse, da sich hierbei Rückschlüsse auf die funktionelle Integrität der transplantierten Zellen *in vivo* ableiten lassen. Dazu wurden männlichen Sprague Dawley-Ratten 3×10^9 EGFP- oder hIL 10-Viruspartikel (bzw. 0.9-%ige NaCl-Lösung als Kontrolle) in die Schwanzvene injiziert. Nach 48 h erfolgten jeweils die Isolation der KCs und die Injektion von 30×10^6 Zellen in die mit Cyclosporin A vorbehandelten Empfängertiere. Die Tiere wurden nach weiteren 24 h getötet und die Lebern für nachfolgende Untersuchungen entnommen. Die Positiv- bzw. Negativkontrollgruppe umfasste Tiere, denen der EGFP- oder hIL 10-Virusstock (jeweils 3×10^9 ffu/Tier) bzw. NaCl verabreicht wurde und über den gesamten Versuchszeitraum in gleicher Weise wie die Repopulationstiere behandelt wurde (siehe Materialien und Methoden).

Um die Fragestellung zu beantworten, ob die Transplantation und die Neuansiedlung von transduzierten KCs auch zur Expression des spezifischen Genprodukts in der Leber führt, wurde zunächst bezüglich des Kontrollvirus EGFP eine PCR der cDNA aus dem Leberhomogenat durchgeführt (Abb. 34). Hierbei ergab die PCR-Amplifikation das vorhergesagte Basenpaarfragment für EGFP (555 bp) in den entsprechenden Positiv-Kontrollen. Das EGFP-Signal konnte auch in den isolierten KC-Population der Spendertiere nachgewiesen werden, welches belegt, dass KCs *in vivo* transduziert werden können. Außerdem bestätigt die, wenn auch schwache Bande des EGFP-Signals im Repopulationstier, dass auf RNA-Ebene die Expression des Transgens in der Leber des Empfängertieres nachweisbar ist, was zugleich ein Beweis für die Funktionalität der Methode ist. Der Nachweis des Transgenproduktes auf Proteinebene mittels Western Blot oder Fluoreszenzmikroskopie konnte jedoch nicht geführt werden. Unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers konnte mittels Western Blot nur die 27 kDa-Bande in den EGFP-Kontrolltieren (= Positiv-Kontrolle) nachgewiesen werden (Abb. 35). Das Ergebnis des Western Blots zeigte sich auch in der Fluoreszenzmikroskopie, wo EGFP-positive Zellen wiederum nur in den Images der Positiv-Kontrolltiere beobachtet werden konnten (Abb. 36).

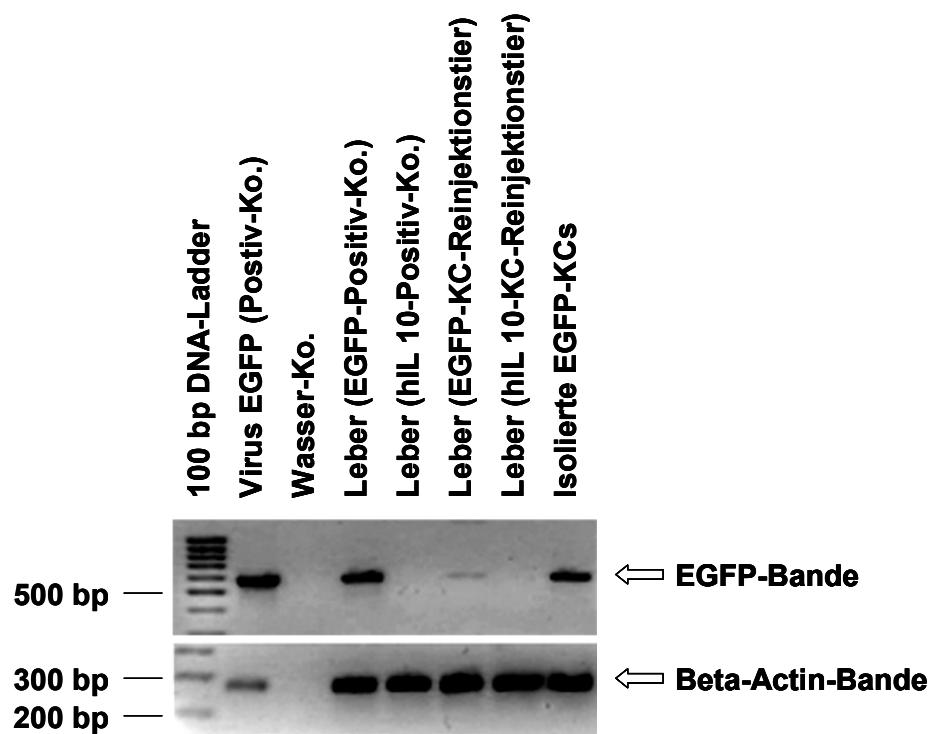


Abb. 34: EGFP-Expressionsnachweis mittels RT-PCR aus Lebergeweben von unterschiedlich vorbehandelten Tieren.

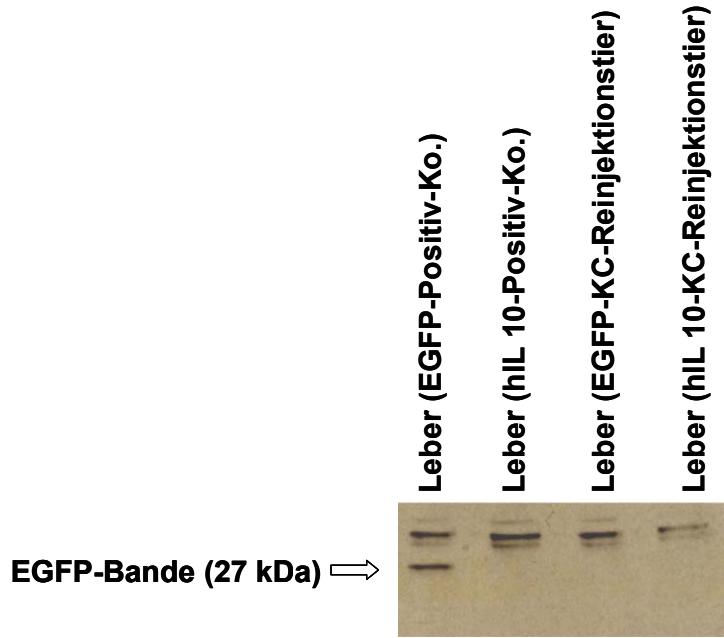


Abb. 35: EGFP-Expressionsnachweis mittels Western-Blot aus Lebergeweben von unterschiedlich vorbehandelten Tieren.

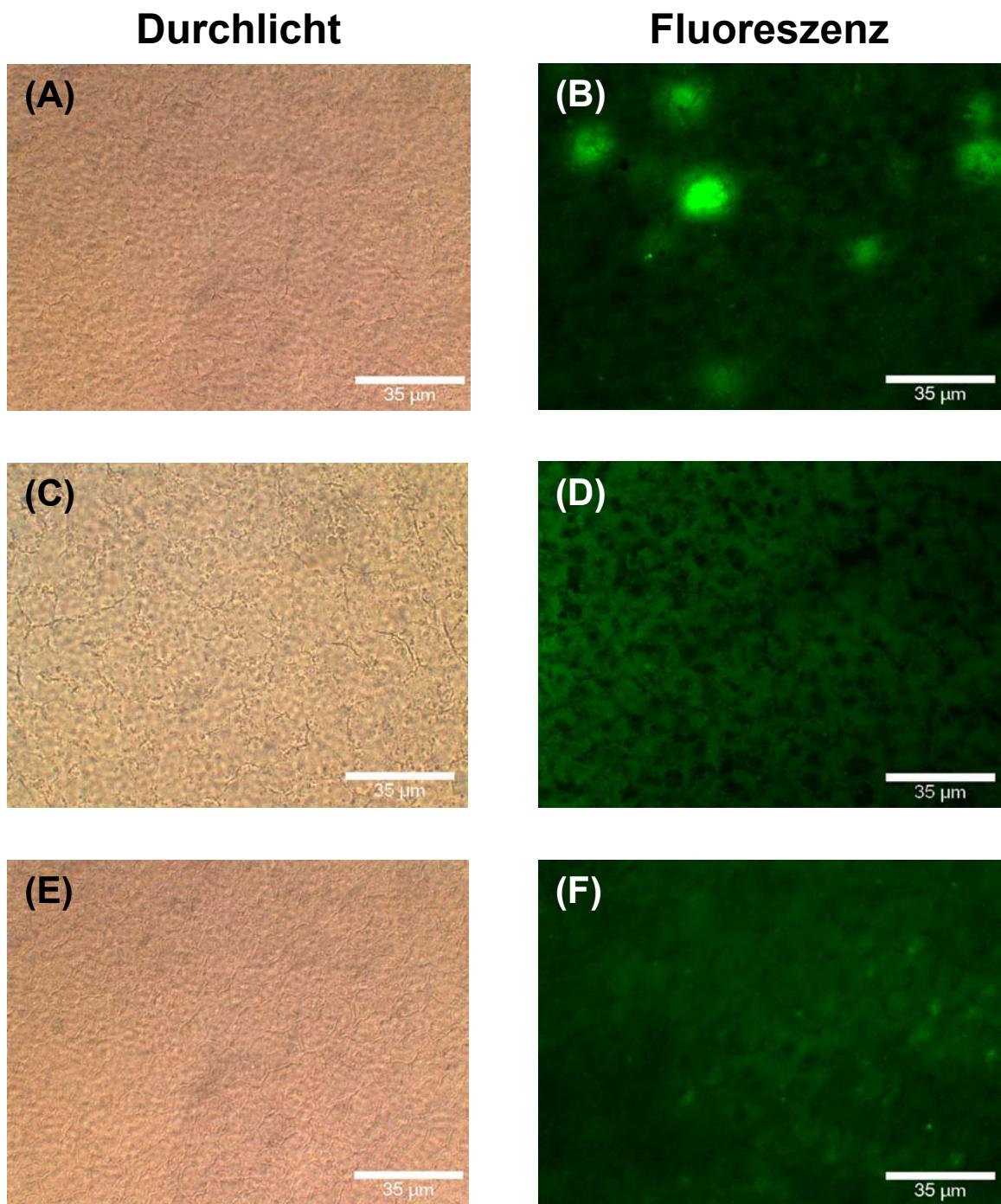


Abb. 36: Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie von Lebergeweben bei unterschiedlicher Vorbehandlung der Tiere. Durchlichtaufnahme eines (A) EGFP-Positiv-Kontrolltieres, (C) EGFP-KC-Reinjektionstieres, (E) NaCl-Negativkontrolltieres; Fluoreszenzaufnahme eines (B) EGFP-Positivkontrolltieres, (D) EGFP-KC-Reinjektionstieres, (F) NaCl-Negativkontrolltieres (Repräsentative Histologie, Vergrößerung 400 x).

Bei dem eingesetzten Targetgen hIL 10 zeigte sich ein ähnliches Bild. Die Expression des Transgenproduktes konnte bei den Repopulationstieren erneut auf RNA-Ebene

erbracht werden. Ein Nachweis des Proteins durch Western Blot bzw. Bestimmung der Serumproteinkonzentration mittels ELISA war jedoch nicht möglich. Im Einzelnen wiesen die LC-Daten der hIL 10-KC-Repopulationstiere eine etwa 14-fach höhere Expression des Transgens bezogen auf die entsprechenden EGFP-Kontrollen auf (Abb. 37).

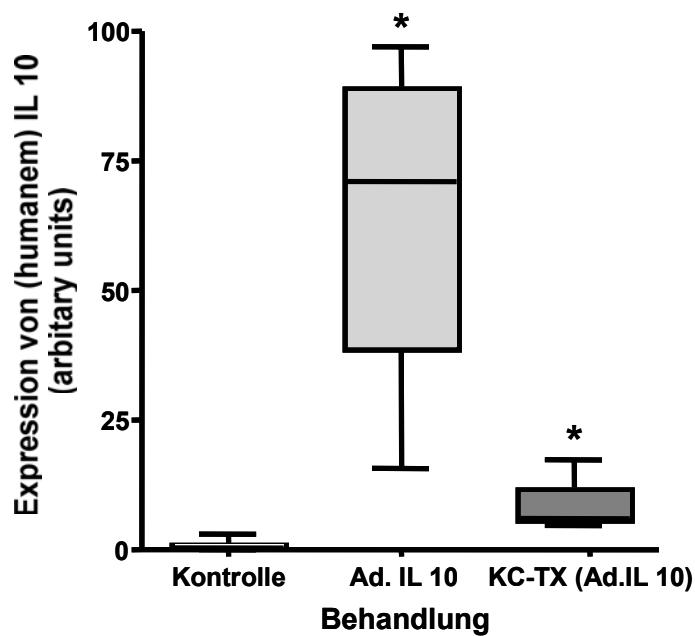


Abb. 37: Quantitative Auswertung der Expression von hIL 10 mittels Light Cycler im Lebergewebe bei unterschiedlicher Vorbehandlung der Tiere. (n = 4 pro Gruppe, *p < 0,05 bezogen die Werte der EGFP-Kontrollgruppe).

Beim entsprechenden Western Blot wurde allerdings erneut lediglich die 18 kDa große hIL 10-Bande bei den Positiv-Kontrolltieren erhalten (Abb. 38). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Konzentration von hIL 10 im Serum der Versuchstiere, wo wiederum nur bei den hIL 10-Positiv-Kontrollen eine Hochregulation beobachtete wurde (Abb. 39).

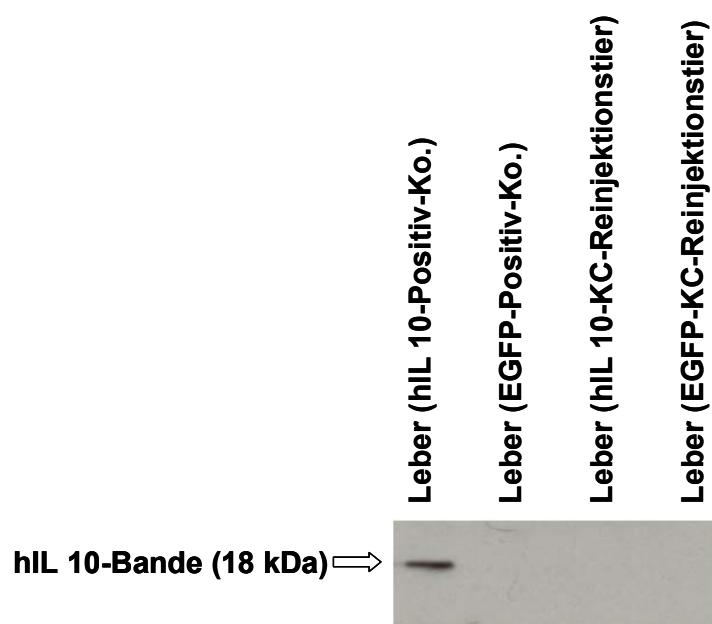


Abb. 38: hIL 10-Expressionsnachweis mittels Western-Blot aus Lebergeweben von unterschiedlich vorbehandelten Tieren.

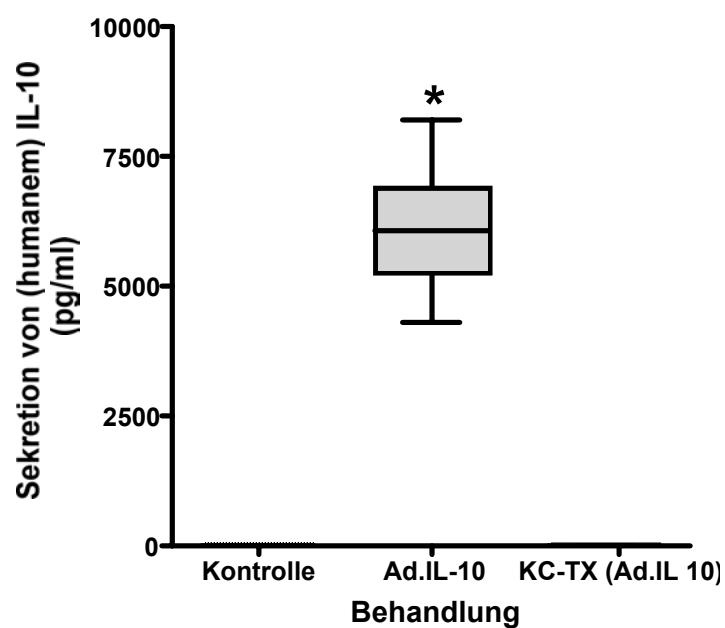


Abb. 39: Serum hIL 10-Konzentration der Tiere bei unterschiedlicher Vorbehandlung. (n = 4 pro Gruppe, *p < 0,05 bezogen auf die Werte der EGFP-Kontrollen).

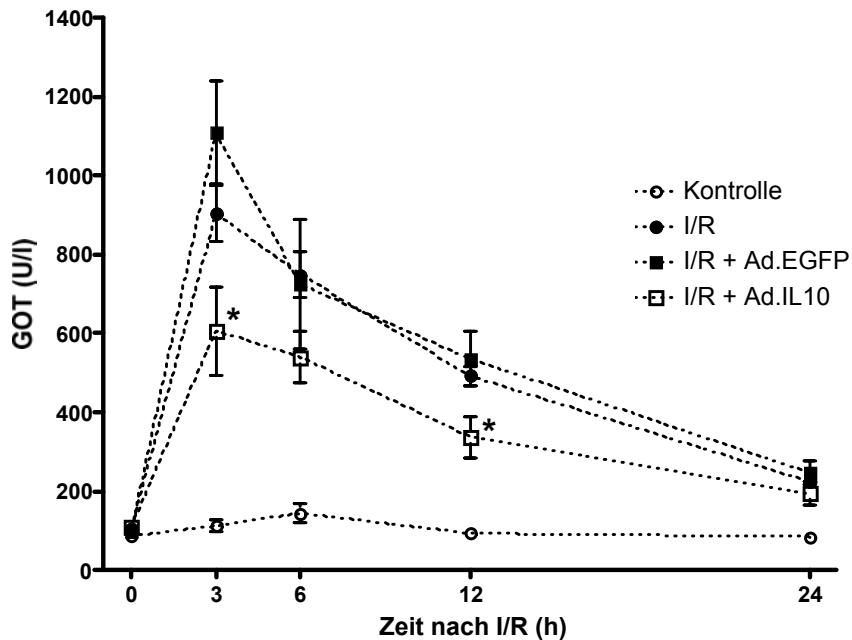
5.5 Effekte der adenoviralen Überexpression von humanem Interleukin 10 in einem Ischämie-/Reperfusions-Schädigungsmodell der Leber

Da IL 10 ein wichtiges anti-inflammatorisch Zytokin des Organismus darstellt, sollte dessen Überexpression in der Leber einen protektiven Effekt bei verschiedenen hepatischen Schädigungen bewirken. Die hepatoprotektiven Eigenschaften von IL 10 wurden bereits von mehreren Arbeitsgruppen in verschiedenen Leberschädigungsmodellen (u.a. Endotoxin, Galaktosamin) demonstriert (81; 128).

In der vorliegenden Studie sollte in dem eingesetzten Ischämie-/Reperfusionsmodell, einem von KCs abhängigen akuten Schädigungsmodell der Leber, geklärt werden, ob die Überexpression von hIL 10 einen protektiven Effekt hierbei vermittelt. Die Bestimmung der Aspartat Aminotransferase (AST = GOT) und Alanin Aminotransferase (ALT = GPT) sind hierbei ein Maß für die Schädigung des gesamten Lebergewebes. Das Maximum der Hochregulation wurde sowohl bei den GOT- als auch GPT-Werten in den meisten der untersuchten Gruppen nach 3 h erreicht. Bei den Tieren, die die transduzierten KCs injiziert bekamen, lagen jeweils die GOT- und GPT-Werte, mit Ausnahme des 3 h GOT-Wertes bei der hIL 10-Repopulationsgruppe, höher, verglichen mit den entsprechenden Positiv- bzw. Negativkontrolltieren. Unter Berücksichtigung der durchgeführten Voruntersuchungen, bei denen gezeigt werden konnte, dass die Expression des Transgens bei den Repopulationstieren nicht auf Proteinebene nachweisbar ist, ist eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung, dass durch die zusätzliche Neuansiedlung von KCs eine größere Anzahl dieses Zelltyps in der Leber vorliegt und dadurch eine stärkere Leberschädigung induziert wird. Im Detail lagen die GOT-Werte bei den Tieren, die die EGFP-KCs injiziert bekamen, nach 3 h bei 1306,0 U/l (\pm 153,2 U/l) und die GPT-Werte hatten nach der gleichen Periode einen Wert von 932,0 U/l (\pm 515,1 U/l). Die GOT-Werte bzw. GPT-Werte der mit hIL 10-KC-Repopulationsgruppe erreichten ein Niveau von 946,5 U/l (\pm 301,7 U/l) bzw. von 753,0 U/l (\pm 452,8 U/l) 3 h nach der I/R. Bei den entsprechenden Kontrollen waren die GOT- und GPT-Konzentrationen signifikant verringert in Tieren, welche mit Ad5.hIL 10 vorbehandelt wurden (Abb. 40 A/B). Im Detail stiegen die GOT-Werte der Ad5.EGFP-vorbehandelten Gruppe nach 3 h auf 1107,6 U/l (\pm 292,1 U/l) und die GPT-Werte erreichten ein Niveau von 732,0 U/l (\pm 360,2 U/l). Die GOT-Werte der mit Ad5.hIL 10-vorbehandelten Gruppe lagen nach

dem gleichen Zeitraum bei 607,0 U/l ($\pm 274,7$ U/l) bzw. die GPT-Werte hatten ein Niveau von 322,0 U/l ($\pm 114,2$ U/l).

(A)



(B)

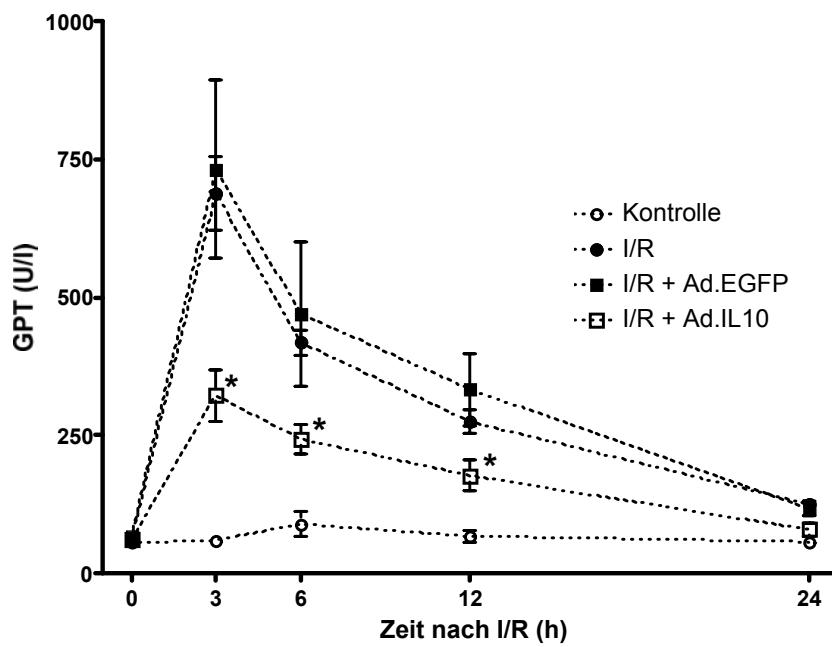


Abb. 40: Zeitlicher Verlauf der Lebertransaminasen ((A) GOT/(B) GPT) nach Ischämie-/Reperfusions schädigung bzw. einer Sham-OP und unterschiedlicher Vorbehandlung der Tiere. Effekte der adenoviralen Überexpression von hIL 10 nach Ischämie-/Reperfusions- bzw. Sham-OP. Die Werte entsprechen Mittelwerten \pm Standardfehler ($n = 5$ pro Gruppe, $*p < 0,05$ bezogen auf die Werte der EGFP-Kontrollen zu den entsprechenden Zeitpunkten).

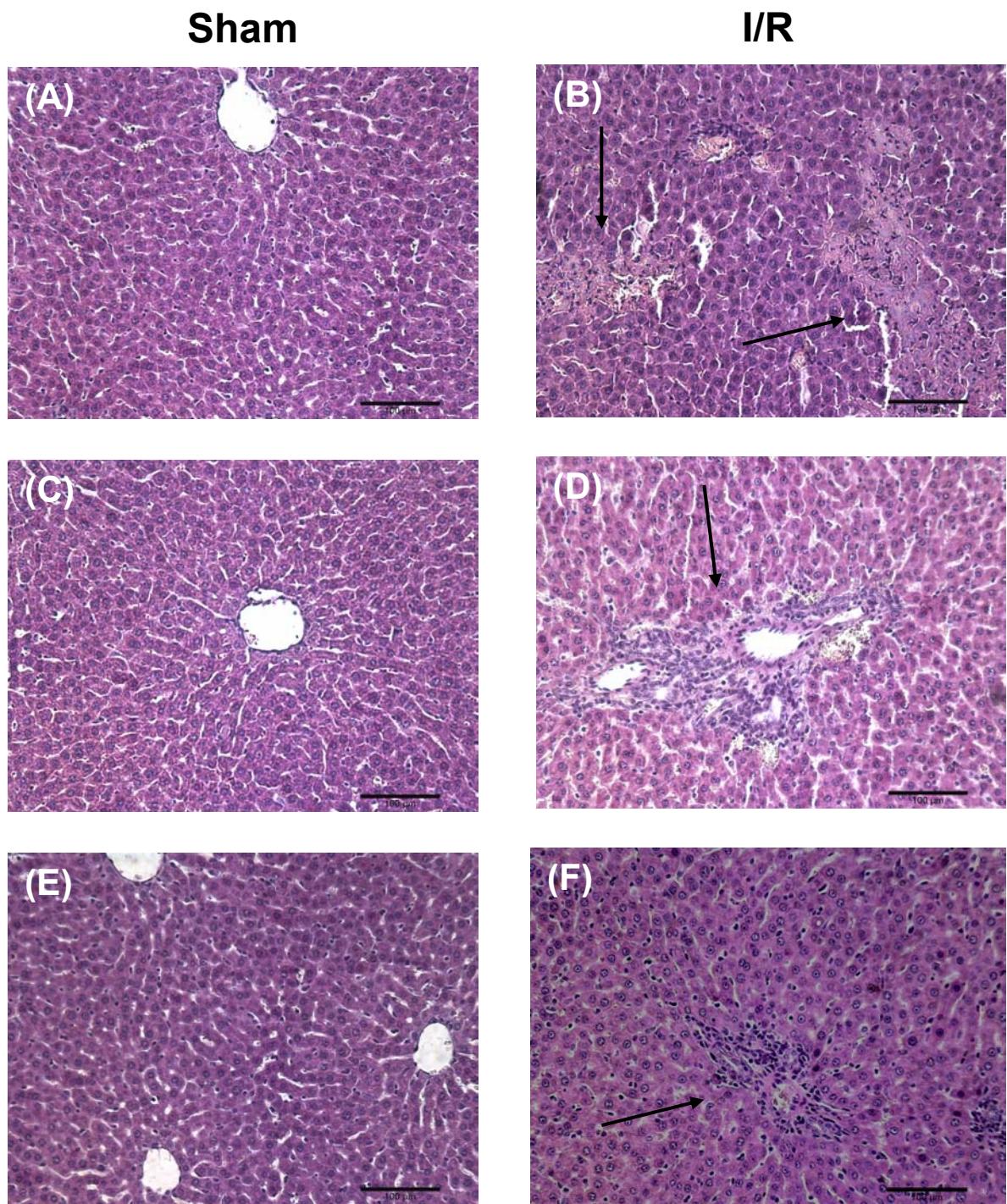


Abb. 41: Histologische Darstellung von Lebergeweben nach Ischämie-/Reperfusionsschädigung bzw. einer Sham-OP und unterschiedlicher Vorbehandlung der Tiere. (A) NaCl-Sham-OP, (B) NaCl-I/R-OP, (C) Ad5.EGFP-Sham-OP, (D) Ad5.EGFP-I/R-OP, (E) Ad5.hIL 10-Sham-OP, (F) Ad5.hIL 10-I/R-OP. Nekrotisierende Areale bzw. Akkumulation und Infiltration von Entzündungszellen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. (Repräsentative Histologie, Vergrößerung 400 x).

Auch die histopathologische Auswertung der Lebern, 24 h nach Durchführung der Ischämie-Reperfusion, verdeutlicht eine verminderte Inflammation und Nekrose im Lebergewebe der mit Ad5.hIL 10-vorbehandelten Tiere im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen. So sind v.a. in den Gewebeschnitten der Tiere, die mit dem humanen IL 10-Virusstocks vorbehandelt wurden, deutlich weniger fokale Schädigungsareale und eine geringere Infiltration von Entzündungszellen nachweisbar (Abb. 41).

5.6 Kryokonservierung von Kupffer-Zellen

5.6.1 Überlebensrate von kryokonservierten Kupffer-Zellen

Wasser ist der Hauptbestandteil aller lebenden Zellen und muß für sämtliche Prozesse im Lebenszyklus vorliegen. Das Einfrieren von Zellen ist somit bis jetzt die einzige geeignete Methode, um sie für einen längeren Zeitraum zu konservieren, da jeglicher Stoffwechsel der Zelle gestoppt wird, wenn das Zellwasser in Eis umgewandelt wird (129). Ziel der Experimente war nun eine effiziente Methode der Kryokonservierung von v.a. humanen KCs zu entwickeln, um diese dann für nachfolgende Untersuchungen zur Verfügung stellen zu können.

10 Millionen KCs wurden unter aseptischen Bedingungen in jeweils 1 ml Einfriermedium mit dem Nicool LM 10-Gerät der Firma Air Liquid eingefroren. Die endgültige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -178 °C. Die eingefrorenen Ratten- bzw. humanen KCs wurden im 37 °C warmen Wasserbad schnell aufgetaut, und die Vitalität der KCs von mindestens 6 unterschiedlichen Spendern/Tieren mit einer Trypanblau-Färbung bestimmt (siehe Materialien und Methoden). Der Prozentsatz an vitalen Zellen nach dem Auftauen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Überlebensrate in \%} = \frac{\text{Anzahl funktionell intakter Zellen nach dem Auftauen}}{\text{ursprünglich eingefrorene Zellzahl}} \times 100$$

Mit einer Equilibrationszeit von 10 min, dem dargestellten Einfrierprogramm (Abb. 11) und einer Lagerperiode von mindestens 24 h wurden bei den Ratten-KCs 57,3 % ($\pm 8,8\%$, Abb. 42 A) und bei humanen KCs 64,2 % ($\pm 13,4\%$, Abb. 42 B) intakte Zellen nach dem Auftauprozess im Vergleich zur Anzahl der KCs direkt nach der

Isolation erhalten. Unterschiedliche Lagerperioden (1 Tag bis 3 Monate) hatten hierbei keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebensrate nach dem Auftauen.

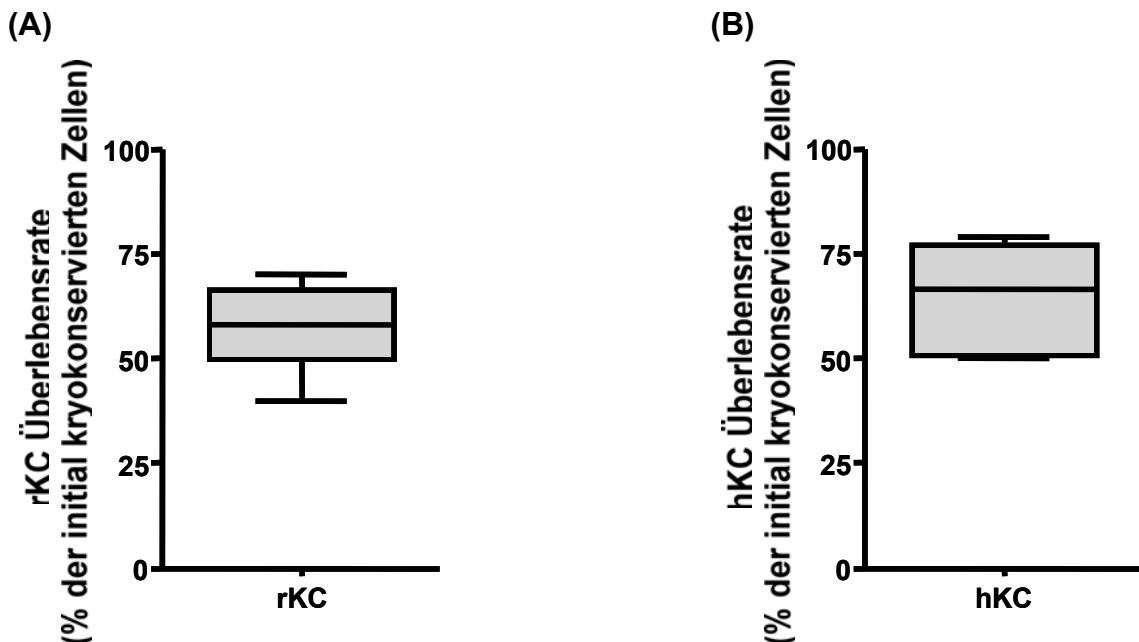


Abb. 42: Überlebensrate von kryokonservierten KCs nach dem Auftauen. KCs wurden isoliert und kryokonserviert, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Direkt nach dem Auftauen wurde die Überlebensrate von Ratten- (A) und humanen KCs (B) mit Trypanblaufärbung bestimmt. (n = 6 pro Gruppe).

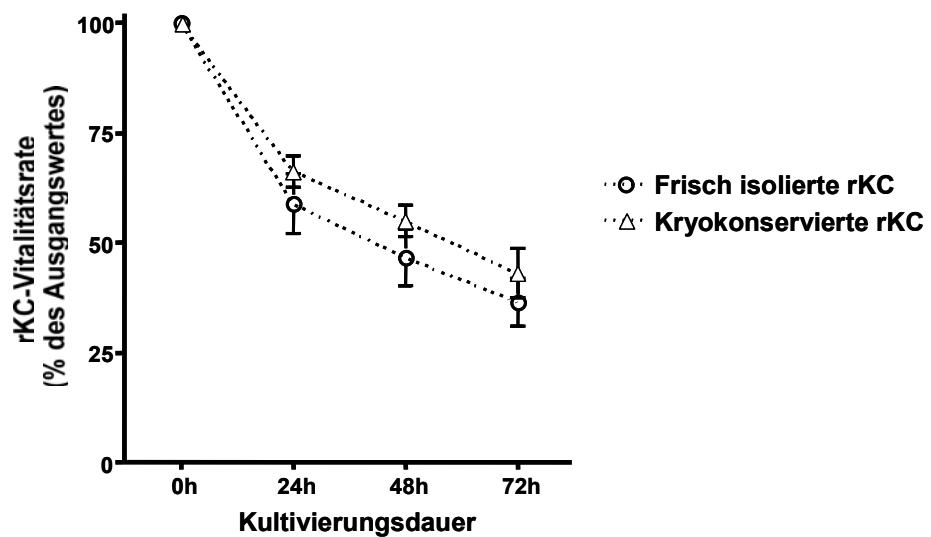
Um eventuelle weitere Unterschiede zwischen frischen und eingefrorenen KCs zu evaluieren, wurden sowohl bei Ratten- als auch bei humanen KCs die Kultivierungsprofile über 3 Tage, die Stimulationsfähigkeit und die Phagozytoseaktivität verglichen.

5.6.2 Kultivierungsprofile von frischen und kryokonservierten Kupffer-Zellen

Von den ausgesäten KCs überlebten nach 3 Tagen in Kultur bei den Ratten-KCs 36,4 % ($\pm 12,1$ %) der frischen und 42,9 % ($\pm 14,8$ %) der eingefrorenen KCs (Abb. 43 A). Frische und kryokonservierte humane KCs zeigten ebenfalls keine signifikanten Änderungen in dem Überlebensprofil über den untersuchten Zeitraum (47,8 % Überlebensrate der frischen KCs und 54,7 % der weggefrorenen KCs nach 72 h in Kultur, Abb. 43 B). Interessanterweise lag über den gesamten Zeitraum sowohl bei den Ratten- als auch bei den humanen KCs der Anteil an vitalen und funktionell

intakten Zellen in der Kryo-Gruppe höher als bei den frisch isolierten Zellen. Dies ist u.a. mit dem Verlust von weniger vitalen Zellen beim Einfrieren bzw. Auftauen zu erklären, wodurch es zu einer gewissen Selektion der KCs und somit zu einer besseren Zellpopulation am Kultivierungsbeginn kommt. Weiterhin wiesen die kultivierten KCs, unabhängig davon ob sie kryokonserviert wurden oder nicht, über den gesamten Zeitraum eine für diesen Makrophagentyp charakteristische Zellmorphologie auf.

(A)



(B)

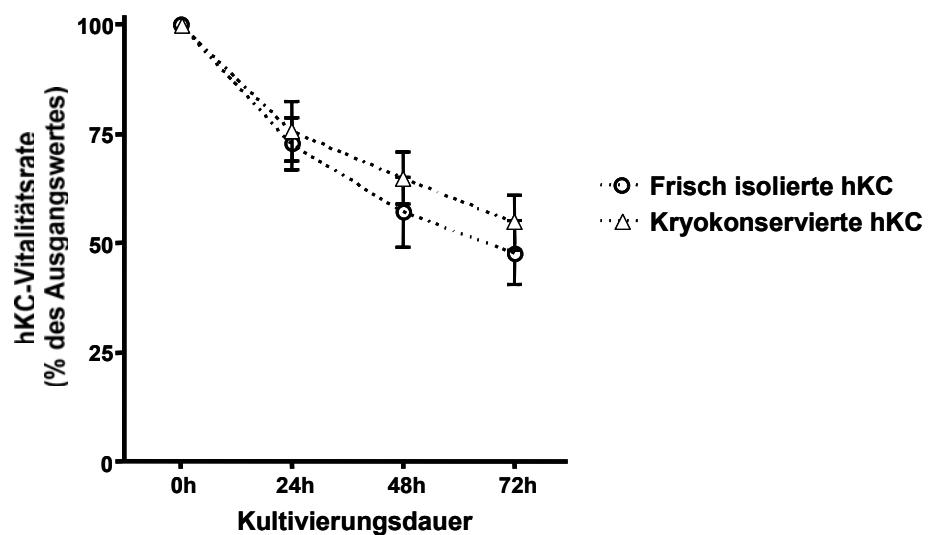


Abb. 43: Kultivierungsprofile von frischen und kryokonservierten KCs. KCs wurden isoliert und entweder direkt kultiviert oder zunächst kryokonserviert. Nach dem Auftauen wurde die Vitalität von Ratten- (A) und humanen KCs (B) mit direkt kultivierten Kontrollen über einen Zeitraum von 72 h verglichen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardfehler ($n = 6$ pro Gruppe).

5.6.3 Zytokinsekretion von frischen und kryokonservierten Kupffer-Zellen nach LPS-Stimulation

Zur Bestimmung von Unterschieden im Stimulationsverhalten frischer und eingefrorener KCs wurde die Sekretion von Zytokinen nach Aktivierung mit LPS (10 µg/ml) bzw. PBS als Kontrolle bestimmt. LPS ist eine Komponente der Zellwand gramnegativer Bakterien und bewirkt die Aktivierung von KCs unter Einbeziehung spezifischer Signalkomponenten wie CD 14 oder TLR 4. Die Interaktion von LPS mit dem membranständigen CD 14/TLR 4-Komplex und die daraus resultierende Induktion von intrazellulären Signalkaskaden führt u.a. zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF κ B sowie nachfolgend, zur Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL 1, IL 6 oder TNF α . Nach jeweils 24-stündiger Stimulation zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zytokinspiegel (IL 6, TNF α) im Überstand mittels ELISA gemessen. Frisch isolierte und frisch aufgetaute KCs zeigten dabei keine signifikanten Unterschiede in den Zytokinlevels. Die Antwort auf das Endotoxin LPS war bei beiden Gruppen vergleichbar. Die Stimulation mit LPS führte hierbei zu der erwarteten signifikant unterschiedlichen Sekretion von IL 6 und TNF α in Relation mit der PBS-Kontrollgruppe. Vergleicht man dagegen die LPS-induzierte Zytokinsekretion von frischen und aufgetauten Zellen zu unterschiedlichen Stimulationszeitpunkten nach der Isolation bzw. dem Auftauen (0-48 h) konnten keine statistisch relevante Signifikanz gefunden werden (Abb. 44/45). Im Detail führte die LPS-Stimulation von zuvor kryokonservierten Ratten-KCs zu TNF α -Spiegeln im gewonnenen Überstand von 101,4 % (\pm 41,2 %) 24 h dem Auftauen, 96,5 % (\pm 18,9 %) 48 h nach dem Auftauen und 101,8 % (\pm 23,8 %) 72 h nach dem Auftauen verglichen mit TNF α -Werten von frisch isolierten, stimulierten Ratten-KCs. Die IL 6-Sekretion von eingefrorenen Ratten-KCs folgte dem gleichen Schema mit Werten von 109,7 % (\pm 29,3 %) 24 h nach dem Auftauen, 108,0 % (\pm 25,7 %) 48 h nach dem Auftauen und 112,6 % (\pm 31,4 %) 72 h nach dem Auftauen. Bei humanen KCs erreichten die TNF α -Werte nach LPS-Stimulation 104,2 % (\pm 15,7 %) 24 h nach dem Auftauen, 99,4 % (\pm 25,2 %) 48 h nach dem Auftauen und 92,3 % (\pm 10,2 %) 72 h nach dem Auftauen (verglichen mit der TNF α -Sekretion von frisch isolierten, humanen KCs). Ebenfalls zeigte die IL 6-Sekretion von weggefrorenen humanen KCs vergleichbare Ergebnisse mit Werten von 103,9 % (\pm 5,0 %) 24 h nach dem Auftauen, 107,3 % (\pm 9,6 %) 48 h nach dem Auftauen und 99,5 % (\pm 17,7 %) 72 h nach dem Auftauen.

Die Ergebnisse zeigen auf, dass aufgetaute KCs funktionell intakt sind und mit frischen Präparationen verglichen werden können.

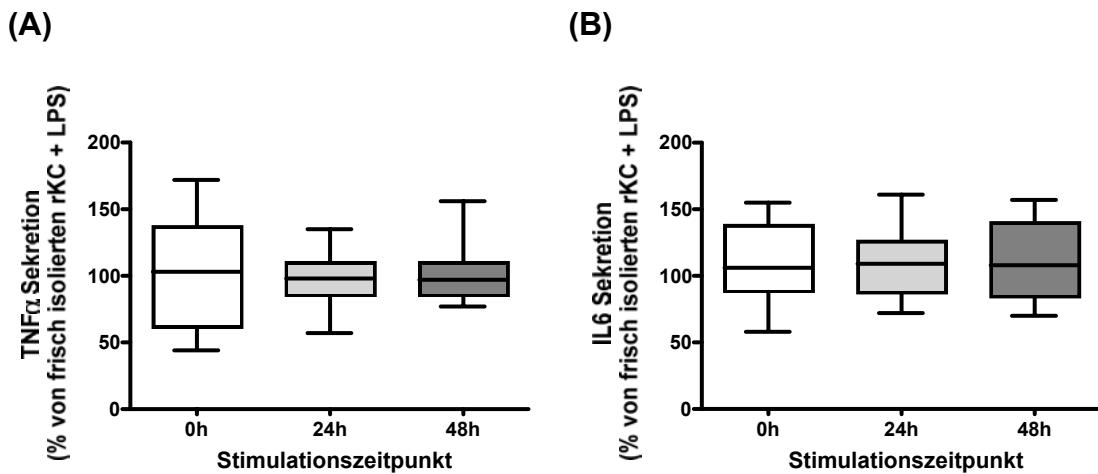


Abb. 44: Zytokinsekretion von kryokonservierten Ratten-KCs. TNF α - (A) und IL 6- (B) Sekretion von frischen und kryokonservierten Ratten-KCs nach LPS-Stimulation (10 μ g/ml) bezogen auf die PBS-Kontrollen. Die Zytokinspiegel im Überstand wurden mittels ELISA bestimmt (n = 6 pro Gruppe).

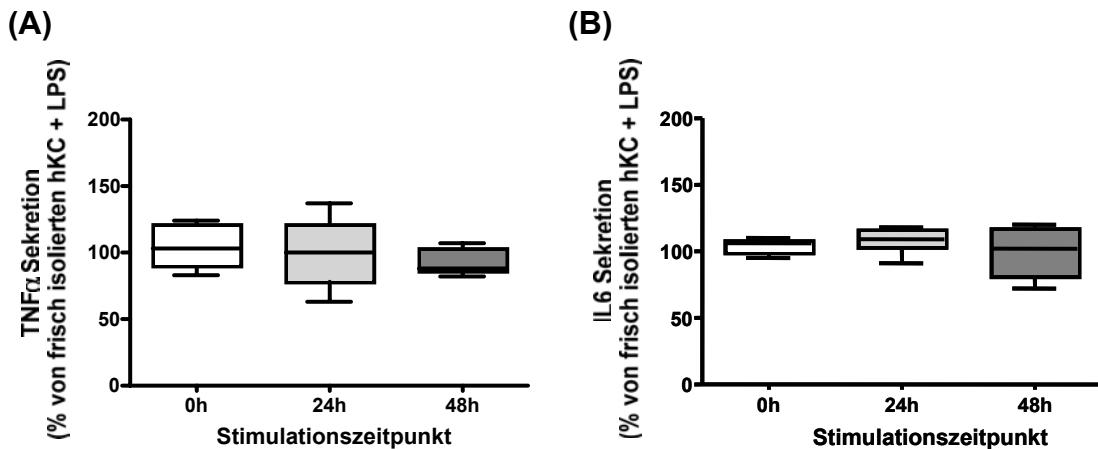


Abb. 45: Zytokinsekretion von kryokonservierten humanen KCs. TNF α - (A) und IL 6- (B) Sekretion von frischen und kryokonservierten humanen KCs nach LPS-Stimulation (10 μ g/ml) bezogen auf die PBS-Kontrollen. Die Zytokinspiegel im Überstand wurden mittels ELISA bestimmt (n = 6 pro Gruppe).

5.6.4 Phagozytoseaktivität von frischen und kryokonservierten Kupffer-Zellen

Neben dem Kultivierungs- und Stimulationsverhalten wurde zur weiteren Validierung der verwendeten Kryokonservierungsmethode auch die Phagozytoseaktivität von kryokonservierten vs. direkt isolierten KCs untersucht. Die Phagozytose stellt einen bedeutenden Prozess *in vivo* dar, der beispielsweise im Gewebeumbau, der Beseitigung von apoptotischen Zellen oder bei der spezifischen, adaptiven Immunantwort gegen Mikroorganismen eine Rolle spielt. Die Phagozytose wird hierbei hauptsächlich über 3 verschiedene Rezeptoren (Komplement-, Fc-, Scavenger-Rezeptor) vermittelt. Bei diesem Vorgang schließen Makrophagen Material mit Hilfe von Pseudopodien in die Zelle ein. Die Phagosomen verschmelzen mit Lysosomen zu Phago-lysosomen, in denen das körperfremde Material enzymatisch, durch Cathepsine, reaktive Sauerstoffmetabolite und Stickoxide in kleinere Fragmente zerlegt wird. Die Phagozytose wird durch sogenannte Opsonine, wie Immunglobuline und dem Komplementfaktor C3b, erleichtert. Diese markieren die Oberfläche des körperfremden Materials (130). Bei den durchgeführten Versuchen wurden KCs mit der 40-fachen Menge an opsonierten, fluoreszierenden Latex-Beads versetzt. Die Inkubation erfolgte für 24 h und das Ausmaß der Phagozytose wurde durch FACS-Untersuchungen und Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Bei anschließenden FACS-Analysen wurde die Menge an phagozytierenden Zellen definiert als die Zahl geshifteter Ereignisse in Region A (entsprechend Gate B), wobei die mittlere geometrische Fluoreszenzintensität der Region A für die Anzahl phagozytierter Beads pro KC steht. Nach 24 h gab es keine signifikanten Unterschiede bei der Phagozytoseaktivität zwischen den frischen und kryokonservierten Zellen. In beiden Gruppen waren die Anzahl an phagozytierender Zellen und die Anzahl aufgenommener Beads pro Zelle miteinander vergleichbar. Im Detail shifteten 50,4 % ($\pm 10,4$ %) der frisch isolierten und 55,2 % ($\pm 8,6$ %) der zuvor kryokonservierten Ratten-KCs zu Bereichen höherer Fluoreszenzintensität (siehe Material und Methoden). Die mittleren Fluoreszenzintensitäten beider Gruppen zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($524,3 \pm 103,1$ Einheiten bei frischen Ratten-KCs und $475,4 \pm 148,1$ Einheiten bei den eingefrorenen Ratten-KCs, Abb. 46). Bei humanen KCs lag der Prozentsatz an geshifteten Ereignissen bei 27,7 % ($\pm 5,1$ %) bei frisch isolierten Zellen und bei 31,0 % ($\pm 6,8$ %) von zuvor kryokonservierten KCs. Die Ergebnisse der Fluoreszenzintensität folgten erneut dem gleichen Vergleich mit $422,3 (\pm 58,1)$ Einheiten bei

frisch isolierten und $356,7 (\pm 78,7)$ Einheiten bei zuvor kryokonservierten humanen KCs, jeweils im Vergleich mit entsprechend mitgeführten Kontrollen (Abb. 47).

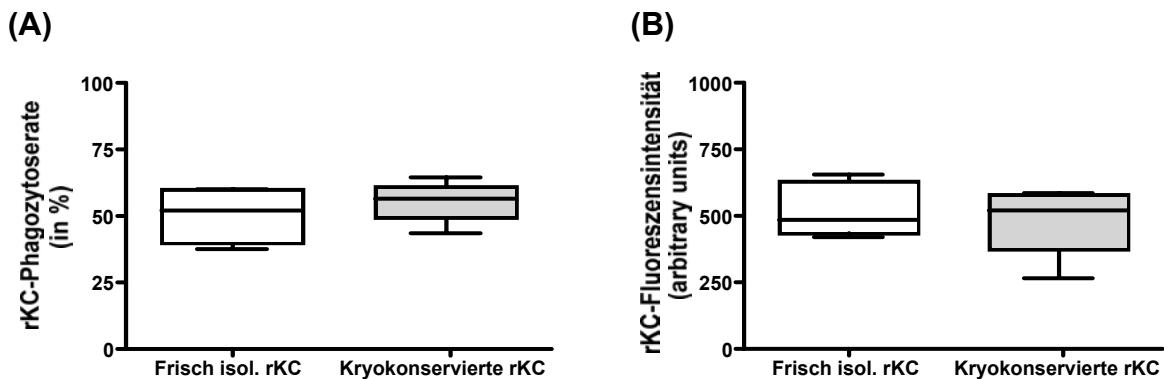


Abb. 46: Phagozytose von kryokonservierten Ratten-KCs. Quantifizierung der Aufnahme von FITC-markierten Latex-Beads von Ratten-KCs durch FACS-Analyse wie unter Material und Methoden beschrieben. Die Anzahl an geshifteten KCs in Region A dient als Indikator der Phagozytose **(A)** und die mittlere Fluoreszenzintensität von Region B steht für die Zahl an Latex-Beads die pro Zelle aufgenommen wurden **(B)** ($n = 6$ pro Gruppe).

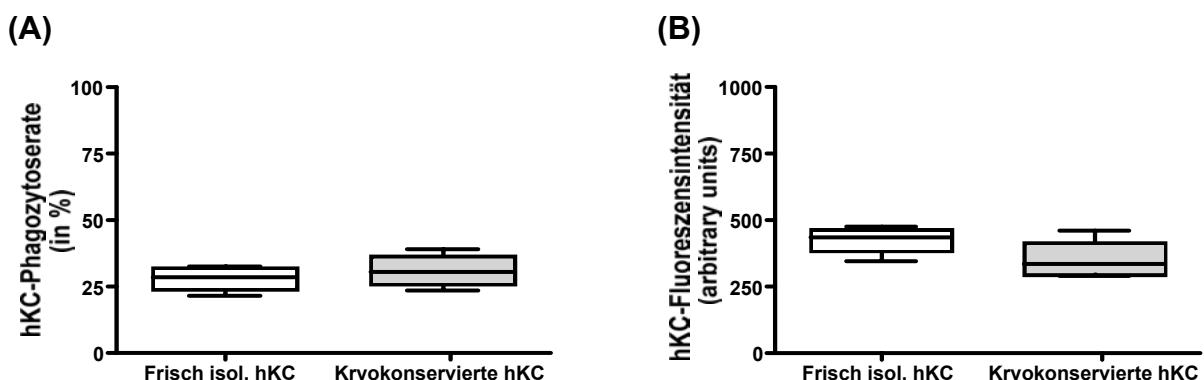


Abb. 47: Phagozytose von kryokonservierten humanen KCs. Quantifizierung der Aufnahme von FITC-markierten Latex-Beads von humanen KCs durch FACS-Analyse wie unter Material und Methoden beschrieben. Die Anzahl an geshifteten KCs in Region A dient als Indikator der Phagozytose **(A)** und die mittlere Fluoreszenzintensität von Region B steht für die Zahl an Latex-Beads die pro Zelle aufgenommen wurden **(B)** ($n = 6$ pro Gruppe).

Die Ergebnisse der FACS-Analysen konnten durch Fluoreszenzmikroskopie bestätigt (Abb. 48) werden.

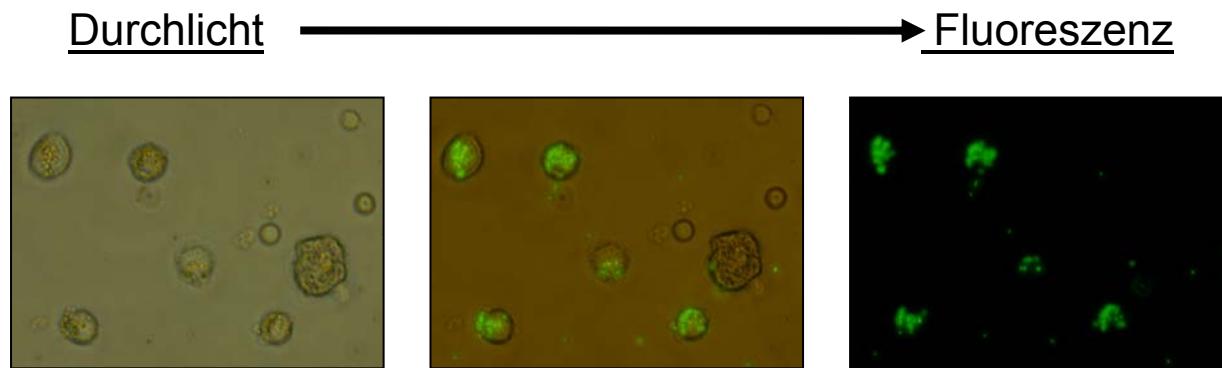


Abb. 48: Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von KCs nach 24-stündiger Inkubation mit FITC-markierten Latex-Beads. Repräsentative Aufnahme von kryokonservierten Zellen (Vergrößerung 400 x).

Die vergleichbaren Phagozytoseaktivitäten zwischen den frisch isolierten und kryokonservierten KCs weisen erneut darauf hin, dass KCs keine erkennbaren Schäden durch den Ein- bzw. Auftauprozess erleiden.

Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung zwischen frisch isolierten und zuvor kryokonservierten KCs führen, sowohl bei den Ratten- als auch humanen KCs, zu der Schlussfolgerung, dass diese neue Methode der Kryokonservierung von KCs eine sichere und valide Methode bietet, KCs über einen längeren Zeitraum zu lagern, akkumulieren und für entsprechende Folgeexperimente zur späteren Verfügung zu stellen.

6 Diskussion

Kupffer-Zellen sind die sessilen Lebermakrophagen. Sie sind an der Pathogenese von zahlreichen inflammatorischen Krankheiten, wie z. B. der Alkohol- (131) oder D-Galaktosamin- (132) induzierten Leberschädigung, der Ischämie-/Reperfusions-schädigung (120; 133) oder der primären Dysfunktion nach einer Leber-transplantation (134), beteiligt. Die Repopulation der Empfängerleber mit genetisch veränderten Kupffer-Zellen nach erfolgter Transplantation scheint deshalb eine alternative Strategie bei der Behandlung von Lebererkrankungen zu sein, bei denen dieser, für die Inflammation bedeutende, Zelltyp beteiligt ist. Basierend auf Vorarbeiten war somit das Ziel der Studie eine weiterführende Charakterisierung und die Evaluation der Effekte der Repopulation von adenoviral transduzierten KCs in einem akuten hepatischen Schädigungsmodell (Ischämie-/ Reperfusions-Schädi-gungsmodell).

6.1 Die verwendete Isolationsmethode führt zu einer funktionell intakten Kupffer-Zell-Population

Zur Generierung einer reinen KC-Population für biochemische und Zell-physiologi-sche Untersuchungen wurden bereits zahlreiche Isolationsmethoden publiziert. Das in der vorliegenden Studie als Basis verwendete Protokoll ist eine einfache und schnelle Methode, dessen Fokus auf der Isolation der Makrophagenpopulation der Leber liegt. So wurde diese nicht parenchymatische Leberzellfraktion mit nur gerin-gen Änderungen nach dem Isolations-Protokoll von Smedsrød und Pertoft gewonnen (siehe Materialien und Methoden) (111) und das Protokoll speziell für die Gewinnung der KCs weiter optimiert (112). Grundlage der Isolation ist die Kollagenase-Perfusion der Leber, isopyknische Sedimentation in Percoll® und die selektive Adhäsion der Zellen in Kultur. Das Ziel war eine große Anzahl an reinen, vitalen und funktionell intakten Zellen zu erhalten, die keine wesentlichen Veränderungen in ihren physiolo-gischen Eigenschaften und keine Schädigung ihrer Zelloberfläche aufwiesen.

Zu der Gewinnung einer Leberzellsuspension wurden bereits zahlreiche mechani-sche (135) und v.a. enzymatische Methoden (136) beschrieben. Der enzymatische Aufschluss der Leber wird heute hauptsächlich mit Kollagenase durchgeführt (137). Diese Protease besitzt gegenüber anderen proteolytisch wirkenden Enzymen wie

Pronase oder Trypsin den Vorteil, beim Verdau relativ schonend auf das Gewebe und die Zellen zu sein. Beispielsweise werden durch das Einwirken von Pronase bestimmte Rezeptoren auf der Zelloberfläche zerstört, welche erst nach einer gewissen Kulturperiode dort wieder erscheinen. Der Verdau der Leber mit Pronase liefert zwar KCs in einer hohen Ausbeute, die isolierten Zellen sind jedoch wegen der dargestellten Isolationsauswirkungen für Zell-physiologische Studien wenig geeignet. Zur weiteren Aufreinigung und Aufteilung der einzelnen Zellpopulationen der Leberzellsuspension stehen mehrere Möglichkeiten wie z.B. Immunoaffinitäts- (137) oder selektive Zytotoxizitäts-Assays (136), selektive Adhäsion (111), das Sorten von Fluoreszenz- (138) oder magnetisch-gelabelten Zellen und verschiedene Zentrifugationstechniken zur Verfügung. Um eine reine Subpopulation von Leberzellen zu erhalten, ist in der Praxis eine Kombination dieser Methoden empfehlenswert.

In dem hier verwendeten Protokoll erfolgte die weitere Aufreinigung der Leberzellen aufgrund ihrer Größe und Dichte durch verschiedene Zentrifugationsschritte. Bei niedrigen Drehzahlen wurde die parenchymatische Zellfraktion (Hepatozyten) entfernt und die nicht parenchymatischen Zellen durch isopyknische Zentrifugation in Percoll® weiter aufgetrennt. Percoll® ist ein inertes, untoxisches Kolloid aus Siliziumdioxid und Polyvinylpyrrolidon, welches die Morphologie und Vitalität der Zellen nicht weiter beeinträchtigt. Nach der Gradientenzentrifugation wurden die KCs enthaltenen Percoll®-Fraktionen vereinigt, zentrifugiert und für *in vitro* Tests ausgesät. Durch einen Mediumwechsel 15 bis 20 min nach dem Aussäen wird in einem letzten Aufreinigungsschritt die Eigenschaft von KCs ausgenutzt, schnell und selektiv an Plastik oder Glasoberflächen zu adhärieren. Verbliebene Hepatozyten oder Ito-Zellen benötigen länger für die Adhäsion und können somit effizient entfernt werden.

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der KC-Population wurden die Zellen mit Fluoreszenz-markierten Latex-Beads inkubiert, welche selektiv nur von den Makrophagen im allgemeinen, und hier KCs im speziellen, aufgenommen werden. Die Fluoreszenzmikroskopische Auswertung zeigte, dass über 95 % der Zellen die Beads phagozytierten. Das Ergebnis belegte, dass die gewonnene Zellpopulation vital und nahezu frei von Verunreinigungen war. Weiterhin verdeutlichen die in der vorliegenden Studie durchgeführten FACS-Untersuchungen von spezifischen Oberflächenmarkern (CD 68/CD 33) der KCs, dass die Isolation durch die Verwendung von Kollagenase und das Arbeiten auf Eis während des gesamten Vorgangs (139), offensichtlich zu keinen nennenswerten Schäden an der Zelloberfläche der Makrophagenpopulation

führte. Der erhaltene Shift im FITC- bzw. PE-Kanal bewies hierbei, dass keine Veränderungen in den Komponenten der Zytoplasmamembran feststellbar waren. Dieses konnte außerdem durch die Stimulation mit dem Endotoxin LPS und dem dadurch beobachteten Anstieg der Zytokinlevels (TNF α) in den Überständen der KC-Kulturen erneut bestätigt werden. Die Bindung des Liganden LPS an den membranständigen CD 14/TLR 4-Komplex induziert in den Zellen eine komplexe Signalkaskade. Die daraus resultierende Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B führt u.a. zu der verstärkten Expression und Freisetzung der Zytokine, was eine allgemeine Funktionsfähigkeit der Zellen voraussetzt.

6.2 Transplantation von Kupffer-Zellen

Aktivierte KCs sind, wie bereits beschrieben, an der Pathogenese von zahlreichen Lebererkrankungen beteiligt. Die Transplantation von genetisch veränderten KCs in den Empfängerlebern könnte sich deshalb zu einer vielversprechenden, alternativen Strategie bei der Behandlung von Lebererkrankungen entwickeln, bei denen dieser Zelltyp beteiligt ist. Im Vergleich zur Transplantation von Hepatozyten, wo mehrere Studien bereits nützliche Effekte in den Empfängerlebern demonstrierten konnten (51; 140), wurden bei den KCs bisher nur einzelne Studien durchgeführt. So findet sich lediglich eine Voruntersuchung, in der in einem Mausmodell radioaktiv-markierte KCs isoliert und in die Empfängertiere intravenös appliziert wurden (141). Hierbei konnte 80 % der Radioaktivität nach 24 h in der Leber des Empfängers lokalisiert werden. Die Frage der Integrität sowie der allgemeinen Funktionsfähigkeit der transplantierten Zellen im Empfänger musste jedoch unbeantwortet bleiben, konnte doch u.a. eine Phagozytose radioaktiver Partikel durch die sessilen KCs des Empfängers nicht ausgeschlossen werden. In einer weiteren Publikation wurden bereits die protektiven Effekte von *in vivo* adenoviral transduzierten, transplantierten KCs in einem I/R-Schädigungsmodell bewiesen (73). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der Gentransfer von mit Ad5.SOD1-transduzierten KCs, und deren Reinfektion mit Cyclosporin A vorbehandelte Empfängertiere, zu einer Überexpression des Transgens in den Empfängerlebern führt. Die Funktion der Superoxid-Dismutase ist die „Entgiftung“ bzw. Reduktion von Superoxid-Radikalen zu Wasserstoffperoxid, welches dann katalytisch weiter (u.a. mittels Glutathionperoxidase) abgebaut wird. Die Tiere, die mit Ad5.SOD1-transduzierten KCs behandelt wurden, zeigten eine signifikante Redu-

zierung der Lebertransaminasen (GOT u. GPT) nach erfolgter Ischämie-Reperfusion der Leber, welches auch durch histo-pathologische Auswertungen bestätigt wurde.

6.2.1 Die Vorbehandlung der Empfängertiere mit Cyclosporin A bewirkt eine signifikante Verbesserung der Repopulationsrate von Kupffer-Zellen

Basierend auf dem dargestellten Erkenntnisstand war das primäre Ziel der Arbeit zunächst die weiterführende Charakterisierung und Optimierung der Repopulation von KCs im Tiermodell. Insbesondere sollte hierbei die Fragestellung geklärt werden, ob sich durch unterschiedliche Vorbehandlungen der Empfängertiere eine Erhöhung der Repopulationsrate von KCs erreichen lässt. Da die Aufnahme von Karbonpartikeln durch KCs eine bereits etablierte Methode ist, wurde hier kolloidales Karbon zur Markierung und Detektion der Makrophagenpopulation der Leber verwendet (27). 24 Stunden später wurden die *in vivo* Karbon-markierten Zellen isoliert und 30×10^6 KCs in die mit Cyclosporin A, Gadoliniumchlorid oder einer Kombination von beiden vorbehandelten Empfängertiere injiziert. Studien von Froh et al. konnten zeigen, dass die Repopulation von KCs nach 24 h ein Maximum erreicht (Abb. 49) (73), so dass dieser Endpunkt übernommen wurde und Leber, Lunge und Milz für entsprechende histologische Untersuchungen gewonnen wurden.

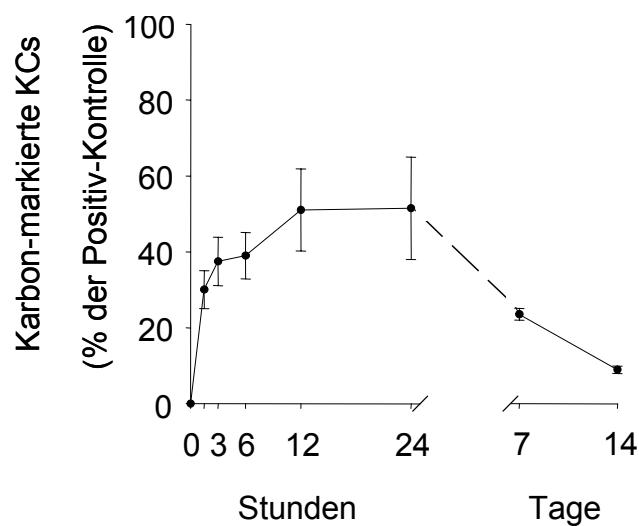


Abb. 49: Zeitverlauf der Integration transplantierter, Karbon-markierter KCs in der Leber des Empfängers (71).

Bei einer initialen Karbonmarkierungsrate von 70 % (73) konnten im Mittel ca. 23 % der KCs in den Lebern der Empfängertiere nachgewiesen werden. Abhängig von der Vorbehandlung der Empfängertiere wurden jedoch signifikante Unterschiede hinsichtlich der Repopulationsrate und der Ansiedlungseffizienz von Karbon-markierten KCs erhalten. So zeigten die mit dem Immunsuppressivum Cyclosporin A behandelten Tiere eine um den Faktor 4 höhere Repopulationsrate und Ansiedlungseffizienz verglichen mit den Gadoliniumchlorid vorbehandelten Tieren bzw. der Kombinationsgruppe, was auf eine entsprechende Beteiligung des Immunsystems bei diesem Vorgang schließen lässt. Durch die Immunsuppression der Tiere wurden Neuan-siedlungswerte von etwa 30 % der eingesetzten Zellzahl erreicht, welche ca. 11 % der gesamten KC-Population des Empfängers entspricht. Dies scheint insgesamt betrachtet eine relativ geringe Anzahl neuangesiedelter Zellen zu sein. Dennoch konnte vor kurzen im Tiermodell gezeigt werden, dass z.B. die Transplantation und Neuansiedlung von nur etwa 2 % Hepatozyten ausreicht, um den Kupffer-Haushalt bei Morbus Wilson zu regulieren (142). Das eingesetzte Immunsuppressivum Cyclosporin A ist ein aus den norwegischen Pilzen *Tolypocladium inflatum* (Gams) und *Cylindrocarpon lucidum* (Booth) isoliertes zyklisches Protein, das aus 11 Aminosäuren besteht. Es gilt heute als eines der Standardmedikamente zur Prävention akuter und chronischer Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation (143; 144). Im Gegensatz zu anderen Medikamenten dieser Gruppe wie Methotrexat oder Azathioprin, die ihre immunsuppressiven Eigenschaften über eine Verminderung der zirkulierenden Lymphozyten entfalten, verhindert Cyclosporin A ihre Aktivierung. Es wirkt fast ausschließlich auf T-Lymphozyten, da es effektiv die Synthese des T-Zell-Aktivators IL 2 hemmt (145; 146). Der Wirkmechanismus, der hier zugrunde liegt, ist die Bindung von Cyclosporin A an Calcineurin, wodurch dessen Interaktion mit NF-AT (nuclear factor activating T-cell), einem Gen-regulierendem Protein, blockiert wird. In aktivierten T-Zellen ist Calcineurin für die Dephosphorylierung von NF-AT verantwortlich. Daraufhin kann NF-AT in den Zellkern transloziert werden und dort die Transkription von zahlreichen Zytokinen (u.a. IL 2, γ -Interferon) und Zelloberflächenrezeptoren induzieren.

Von der zweiten eingesetzten Verbindung, Gadoliniumchlorid, wurden ebenfalls positive Auswirkungen bei dem Versuchsansatz erwartet. Gadolinium ist ein dreierwertiges Kation aus der Serie der Lanthaniden und kann zur Depletion von Kupffer-Zellen eingesetzt werden. Die daraus zum Teil resultierenden hepatoprotektiven Eigen-

schaften dieser Substanz konnten bereits an verschiedenen Leberschädigungsmodellen der Ratte (Endotoxin, Paracetamol, Tetrachlorkohlenstoff, Galaktosamin, Dietyldithiocarbamat, Alkohol) (147-151) demonstriert werden. Der Mechanismus, der zur Ausschaltung bzw. Elimination der Kupffer-Zellen führt, ist noch wenig erforscht. Es wird vermutet, dass Gadoliniumchlorid durch einen Austausch von Ca^{2+} auf der extrazellulären Seite des Calcium-Kanals wirkt und somit den Calcium-Influx und -Efflux blockiert (152; 153). Weiterhin reichert sich i.v.-appliziertes Gadoliniumchlorid in den KCs an und hemmt so u.a. deren Phagozytose (154), Antigenpräsentation und Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (150; 155). Die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass es durch Elimination der sessilen KCs der Empfängertiere zu einer verstärkten Neuansiedlung der transplantierten KCs kommt, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Die erhaltenen Ergebnisse, insbesondere unter Berücksichtigung der Kombinationsgruppe, welche die gleiche Repopulationsrate aufwies wie die mit Gadoliniumchlorid vorbehandelten Tiere, lassen darauf schließen, dass nicht nur die endogenen, sondern auch zahlreiche transplantierte KCs von noch nicht ausgewaschenem Gadoliniumchlorid eliminiert wurden. Die Daten der Repopulation von Karbon-markierten KCs der Gadoliniumchloridgruppe waren faktisch mit denen von unbehandelten Tieren (0,9-%ige NaCl-Lösung, Daten nicht gezeigt) vergleichbar. Eine Veröffentlichung von Hardonk et al. (156) belegt, dass die Neuansiedlungen von endogenen Makrophagen etwa 4 Tage nach i.v.-Applikation von Gadoliniumchlorid wieder beginnt. Eine Änderung des Versuchsprotokolls durch Gabe von Gadoliniumchlorid 5 Tage vor der Injektion der KCs führte jedoch ebenfalls zu keinen positiven Effekten bei der Repopulation (Daten nicht gezeigt). Cyclosporin A war somit das Mittel der Wahl für weiterführende Untersuchungen.

6.2.2 Die Transplantation von Kupffer-Zellen führt zu einer exklusiven Integration der Zellen innerhalb des Zielgewebes

Zusätzlich zum Zielgewebe wurde die Integration Karbon-positiver KCs in anderen Organen der Empfängertiere untersucht. Nach Transplantation von Karbon-markierten KCs konnte lediglich im Milzgewebe vereinzelt am ehesten ungebundenes Karbon detektiert werden. In den Lungengeweben war bei allen Gruppen der Karbon-Nachweis negativ. Durch die Vorbehandlung der Empfängertiere mit Gadoliniumchlo-

rid bzw. Cyclosporin A/Gadoliniumchlorid stieg die Anzahl der nachgewiesenen Karbon-Partikeln im Milzgewebe verglichen mit der Cyclosporin A-Gruppe an. Untersuchungen mit adenoviral transduzierten und in der Folge transplantierten KCs konnten auf RNA-Ebene jedoch die Transgenexpression ausschließlich im Empfängerlebergewebe führen (73), weshalb der Nachweis auf einen verstärkten Abbau der transplantierten KCs zurückzuführen ist und somit auf keinen funktionellen Einbau der Makrophagen schließen lassen. Die Ergebnisse belegen, dass mit KCs ein leberspezifisches Targeting möglich ist und dass die Transplantation dieses Zelltyps potentiell für neue Untersuchungsstrategien eingesetzt werden kann.

6.2.3 Die Transplantation von Kupffer-Zellen hat keine (signifikanten) inflammatorischen Auswirkungen auf das Lebergewebe des Empfängers

Die Belastung des Zielgewebes des Empfängers nach stattgehabter KC-Transplantation wurde u.a. durch Bestimmung der Transaminasen (GOT, GPT) ermittelt. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen KC-transplantierten Tieren sowie der Positiv- und Negativ-Kontrolle bzw. den unterschiedlichen Entnahmzeitpunkten. Vergleicht man die unterschiedlichen Empfängervorbehandlungen findet sich lediglich nach 24 h ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Cyclosporin A bzw. der Kombinationsgruppe vorbehandelten Tiere gegenüber der mit Gadoliniumchlorid alleine vorbehandelten Gruppe, was u.a. auf eine prinzipielle Verminderung der KCs in der Leber des Empfängers durch Gadoliniumchlorid und durch die geringeren Repopulationswerte der Gadoliniumchloridgruppe erklärt werden kann. Insgesamt betrachtet liegen die Werte der serologischen Untersuchung bei allen Gruppen jedoch auf einem niedrigen Niveau, weshalb schlussgefolgert werden kann, dass die Transplantation und Repopulation von KCs für sich alleine keine signifikanten Auswirkungen auf den Empfänger hat. Die Daten der Serumparameter wurden ferner durch histologische Auswertungen der Lebergewebe bestätigt. Die Evaluation der Pathologie zeigte nach KC-Transplantation keine wesentlichen Auffälligkeiten bzw. Veränderungen, da spezifische histologische Entzündungszeichen (Einwanderung von Leukozyten oder nekrotisches Gewebe) nicht beobachtet werden konnten.

6.3 Hochregulation von Genen in der Kupffer-Zell-Population des Zirrhosepatienten, die bei der Inflammation, bei oxidativem Stress sowie der Aktivierung von Kupffer-Zellen eine Rolle spielen

Für die Expressionsanalyse von KCs eines Zirrhosepatienten (Child C, Diagnose: sekundär sklerosierende Cholangitis) und eines Kontrollpatienten (Diagnose: Lebermetastase eines Adenokarzinoms) kamen DNA-Microarrays zum Einsatz. Der hier verwendete GeneChip HGU 133 Plus 2,0 umfasst rund 38500 bekannte humane Gene. Er ist ein geeignetes Mittel, um genomweite Transkriptionsprofile zu erstellen, wobei die Beschränkung von Einzelgenanalysen umgangen wird. Durch diese Methode hat man die Möglichkeit einen schnellen und umfangreichen Überblick der genetischen Veränderungen von KCs in einer zirrhotischen Leber zu erhalten. Von Interesse war hier, veränderte Signalkaskadewege und Moleküle bei einer Leberzirrhose zu identifizieren, wobei der Chip auch insbesondere nach protektiven Gegenregulationen des Organismus hin analysiert wurde. Durch Microarray-Analysen von cDNAs aus Gesamtlebergeweben wurde bereits die starke Hochregulation von inflammatorischen Genen bei Leberzirrhosen primär, biliären Ursprungs bzw. bei Hepatitis B-/C- und Alkohol-induzierten Leberzirrhosen gezeigt (157-162). Bei der auf KCs fokussierten biomedizinischen Pathway-Analyse wurde deutlich, dass bei der Lebermakrophagenpopulation des Zirrhosepatienten v.a. Gene hochreguliert wurden, die bei der Inflammation, bei oxidativem Stress und der Aktivierung der KCs eine Rolle spielen. Die Aktivierung der KCs führt u.a. zur Produktion von physiologisch aktiven Substanzen, wie Eicosanoiden, inflammatorischen Zytokinen (u.a. IL 1, IL 6, TNF α), Wachstumsfaktoren (u.a. TGF β , PDGF), lysosomalen Enzymen, freien Radikalen oder Prostaglandinen, welche wiederum verschiedene Vorgänge und Veränderungen in anderen Zellen induzieren können (69; 118; 120-123; 163). Die KCs nehmen somit eine Schlüsselrolle an zahlreichen pathologischen Prozessen bei der Entstehung einer Leberzirrhose ein. Dies verdeutlicht auch, dass der Microarray Ergebnisse generierte, die u.a. mit Literaturdaten übereinstimmen.

Beim zweiten Augenmerk, der Suche nach hepatoprotektiven Gegenregulationen des Organismus, wurde u.a. eine Hochregulation des IL 10-Signalkaskadewegs festgestellt. Dieses Zytokin wird als der Gegenspieler des Organismus bei entzündlichen Prozessen betrachtet (86). Eine Überexpression dieses entzündungshemmenden Mediators sollte demnach zu einem gewissen Grad das gestörte Verhältnis von pro-

zu anti-inflammatorischen Substanzen bei Leberschädigungen wieder regulieren und somit zu der Organhomöostase beitragen können.

6.4 Adenovirale Transduktion von Kupffer-Zellen

In einem nächsten Schritt wurde nun untersucht, ob sich die KCs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit den eingesetzten adenoviralen Vektorkonstrukten (Ad5.EGFP, Ad5.hIL 10) infizieren lassen. Adenoviren sind im Gegensatz zu Retroviren in der Lage, auch nicht replizierende Zellen effizient zu transduzieren. Sie sind stabil und können daher in großen Mengen produziert werden. Die Integration des Adenovirusgenoms in die chromosomale DNA der Zielzelle ist selten und gehört nicht zum Lebenszyklus dieser Viren (12). Vorangegangene Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass Adenoviren Makrophagen (inklusive KCs) infizieren und daraus resultierend die Expression von funktionellen Transgenen induzieren können (73; 124-126). Die Transduktion durch Adenoviren ist ein Rezeptor-vermittelter Vorgang, welcher neben dem nahezu ubiquitär exprimierten Coxsackieadenovirus-Rezeptor, das alpha V beta 5- ($\alpha V\beta 5$ -) Integrin, das als Co-Rezeptor agiert, einschließt (127). Das alpha V beta 5-Integrin ist auch als Vitronectin-Rezeptor bekannt. Er spielt eine Rolle bei der Zelladhäsion und ist deshalb auf vielen ortsgebundenen Zelltypen zu finden. Dies ist u.a. eine Erklärung, warum Adenoviren viele sessile Zelltypen effizient infizieren, während bei zirkulierenden Zellen, wie beispielsweise Leukozyten, dies nur unzureichend der Fall ist. So konnte für KCs im speziellen demonstriert werden, dass sie das $\alpha V\beta 5$ -Integrin exprimieren und dass die adenovirale Transduktion der Zellen als $\alpha V\beta 5$ -Integrin-abhängiger Mechanismus erfolgt (125). Dieser direkte Weg ist entscheidend, da der positive Nachweis eines Transgens in der KC-Population theoretisch auch durch die Phagozytose von Bestandteilen z.B. *in vivo* transduzierter und später lysierter Hepatozyten stammen könnte (125). Ein Nachteil des adenoviralen Gentransfers ist jedoch, dass nur eine transiente Genexpression erreicht werden kann. So konnte speziell bei den Kupffer-Zellen eine stabile und hohe Expression eines Transgens für mindestens 3 Wochen belegt werden (164), weshalb sich der Einsatz von Adenoviren eher für Kurzzeit- als für Langzeit-Modelle eignet (124). Eine weitere wesentliche Einschränkung des Gentransfers durch Adenoviren liegt, wie bereits erwähnt, bis heute in dessen Unspezifität begründet, da sich das Spektrum der Zielzellen nicht sicher vorhersagen lässt. So werden z.B. neben KCs

auch andere (hepatische) Zelltypen (u.a. Hepatozyten, Ito-Zellen) transduziert. Hieraus ergeben sich prinzipielle Probleme für die Beantwortung von Fragen bzgl. der spezifischen Beteiligung einzelner, transduzierter Zelllinien an der Pathologie *in vivo*. Eine Lösung dieser Problematik könnte neben der Konstruktion zellspezifischer Vektoren die Supplementation oder Repopulation der Leber mit nur einem, durch Adenoviren infizierten hepatischen Zelltyp sein. Der Einsatz von adenoviralen transduzierten Donor-KCs und die resultierende Expression des spezifischen Genprodukts in der Leber, welches die zelluläre Integrität der Zellen voraussetzt, könnte hier diese Fragestellung beantworten.

6.4.1 Die Kupffer-Zellen werden mit den verwendeten adenoviralen Vektoren effizient transduziert

Die Transduzierbarkeit durch Adenovektoren kann in verschiedenen Geweben und Zellen sehr stark variieren und damit die Effizienz einer Gentherapie beeinflussen (165). Zur Überprüfung der Methode wurde deshalb zunächst die Virulenz des Reporterkonstrukts Ad5.EGFP an HepG2-Zellen, einer humanen hepatzellulären Karzinomzelllinie, bestimmt (166). Die Expression des Transgens EGFP stieg dabei abhängig von der eingesetzten Dosis kontinuierlich an, wobei nahezu 90 % der Zellen bei einer MOI von 1000 ffu/Zelle transduziert waren. Der analoge Versuchsanansatz wurde auf primäre Ratten-KCs übertragen. Die Arbeitsgruppe von Wheeler et al. konnte bereits durch *in vitro* Transduktion von primären Ratten-KCs mit Ad5.LacZ, einem weiteren häufig verwendeten Reporterkonstrukt, demonstrieren, dass bei einer MOI von 100 nahezu 100 % der Makrophagen ein positives Staining für die bakterielle β -Galaktosidase zeigten (125). Diese Werte wurden jedoch in der vorliegenden Studie nicht erreicht. Die Fluoreszenz-mikroskopische Auswertung 72 h nach der Virusinfektion mit Ad5.EGFP ergab bei einer MOI von 10 ein Transduktionsmaximum von rund 30 %, wobei auch durch eine Erhöhung der Viruskonzentration, im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Zelllinie, keine Steigerung der Transgenexpression erhalten wurde. Wenn auch die Transduktionsraten der vorangegangenen Veröffentlichung nicht erreicht wurden, belegen die erhobenen Daten dennoch die Funktionalität des eingesetzten Viruskonstrukts. Bei dem verwendeten „therapeutischen“ Virus Ad5.hIL 10 wurde eine ähnliche Transduktionskurve wie beim Kontrollvirus Ad5.EGFP mit einem Maximum der

Expression bei einer MOI von 50 erhalten. Eine weitere Erhöhung der MOI führte analog zum Kontrollvektor zu einer Erniedrigung der hIL 10-Konzentration im Überstand der Zellen als Zeichen des zytopathischen Effekts adenoviraler Proteine oder der hIL 10-Akkumulation.

Ob die Virusbelastung zu einer Aktivierung der KCs führt, wurde außerdem durch Bestimmung der Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine IL 6 und TNF α untersucht. Die IL 6-Spiegel zeigten dabei nach 24 h keine signifikanten Veränderungen. Bei den TNF α -Werten wurde allerdings nach Exposition mit dem Adenovirus ab einer MOI von 1 ein signifikanter Anstieg der Sekretion beobachtet. Ähnliche Effekte wurden beispielsweise auch schon bei Dendritischen Zellen beschrieben (167), was als eine Art primäre Reaktion der Zellen auf bakterielle oder virale Infektionen angesehen werden kann. In der Gesamtbetrachtung lagen die Werte jedoch auf einem niedrigen Niveau, da nach 48 h sowohl die IL 6- als auch die TNF α -Konzentration im Überstand der KCs unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten ELISAs lagen.

Durch eine weitere *in vitro* Voruntersuchung konnten die anti-inflammatorischen Eigenschaften von IL 10 und damit auch das prinzipielle Potential bei verschiedenen inflammatorischen Lebererkrankungen einen protektiven Effekt zu vermitteln gezeigt werden. Nach Stimulation mit dem Endotoxin LPS erhielt man bis zu einer MOI von 50, dem Maximum der Transgenexpression, sowohl bei IL 6 als auch TNF α eine signifikante Reduktion der Sekretion dieser pro-inflammatorischen Zytokine. Die inhibitorischen Eigenschaften auf die IL 6- und TNF α -Produktion sind mit entscheidend für die anti-inflammatorischen Eigenschaften von IL 10, da diese beiden Zytokine oft synergistische Effekte auf verschiedene Signalkaskaden und Prozesse besitzen, wobei sie Entzündungen durch die Induktion von sekundären Mediatoren wie Chemokine, Prostaglandine oder PAF verstärken (86).

6.4.2 Der Nachweis des Transgens nach Transplantation von adenoviral transduzierten Kupffer-Zellen war auf RNA-Ebene erfolgreich

Nachdem durch die Voruntersuchungen belegt wurde, dass KCs in der Leber repopuliert werden und *in vitro* durch Adenoviren transduziert werden können, wurden nun im Tiermodell Sprague Dawley Ratten mit Viruspartikel, welche für die Transgene hIL 10 bzw. EGFP kodieren (Gesamtmenge an Viruspartikeln betrug 3×10^9

ffu/Tier), injiziert. Vorangegangene Untersuchungen konnte bereits zeigen, dass bei einem Titer von 1×10^9 *in vivo* rund 80 % der Leberzellen transduziert werden und eine weitere Erhöhung zu keiner wesentlichen Steigerung der Transgenexpression sondern eher zu einer Leberentzündung führt (168). Bei Virustitern größer als 10^{10} bzw. 10^{11} kann außerdem das Transgen auch relativ schnell entfernt werden (169; 170), da eine Überladung von Zellen mit Viren in einer starken Antwort von zytotoxischen T-Zellen resultieren kann (171). Ergebnisse einer anderen Studie belegen jedoch, dass nach einer optimalen Transduktionsdauer von 72 h (73) und ebenfalls 1×10^9 injizierten Partikeln, die Werte von isolierten, EGFP-positiven Zellen bei lediglich 15 % (125) lagen, weshalb der etwas höhere Titer verwendet wurde.

Die *in vivo* infizierten KCs wurden nach 2 Tagen isoliert und 30×10^6 Zellen in Cyclosporin A vorbehandelte Empfängertiere injiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Tiere getötet und die Lebern für Folgeuntersuchungen isoliert. Die *in vivo* Transduktion von KCs besitzt gegenüber der *in vitro* Methode einige Vorteile. So finden sich *in vitro* bei einer MOI von 10 zwar 30 % transduzierte KCs, die Gesamtzahl der zur Verfügung stehenden KCs reduziert sich aber nach 72 h in Kultur bei den Ratten-KCs auf einen Wert von etwa 36 %, bezogen auf die ursprünglich isolierten Zellen. Dieser Verlust von kultivierten Zellen kann durch die *in vivo* Transduzierung vermieden werden, was u.a. zu einer erheblichen Reduktion der benötigten KC-Spender-tiere führt. Ein weiterer entscheidender Vorteil der *in vivo* Transduktion ist, dass die KCs einer wesentlich geringeren Veränderung des Phänotyps unterliegen, da sie in ihrer physiologischen Umgebung verbleiben. Der erfolgreiche Gentransfer mittels adenoviral transduzierter KCs konnte im Sinne eines „proof of principle“-Experiments sowohl bei dem Kontrollvirus Ad5.EGFP als auch bei dem therapeutischen Konstrukt Ad5.hIL 10 auf RNA-Ebene geführt werden. Auf Proteinebene gelang dieser Nachweis jedoch nicht. Offensichtlich war hier die Sensitivität der Proteinnachweismethoden zu gering bzw. es wurde zu wenig Genmaterial in die Leber eingebracht. So konnten die Proteine der Transgene nur bei den Positiv-Kontrolltieren nachgewiesen werden.

6.5 Die Überexpression von (humanem) Interleukin 10 hat einen protektiven Effekt im akuten Schädigungsmodell der Leber

Der hepatische Ischämie-/Reperfusionsschaden ist nach wie vor eines der Hauptprobleme bei Leberzellresektionen und -transplantationen. Die Unterbrechung der hepatischen Blutzufuhr bei Leberzellresektionen oder -transplantationen ist nötig, um den Blutverlust während der Operation zu reduzieren (128). Der Grad der Schädigung ist teilweise so schwer, dass einige Spenderleberen versagen und eine sofortige Retransplantation erforderlich ist. Durch Tierversuche wurden viele Entzündungsmediatoren, die an der Schädigung beteiligt sind, identifiziert (69; 120; 121; 172; 173). IL 10 ist mit seinen anti-inflammatorischen Eigenschaften von herausragender Bedeutung für den Organismus, indem es über verschiedene Wege die Produktion dieser pro-inflammatorischen Zytokine wie z.B. IL 1, IL 6, IL 8, GM-CSF oder TNF α hemmt (siehe Einleitung). Da bei der hIL 10-KC-Repopulationsgruppe der Nachweis des Transgens auf Proteinebene nicht erfolgreich war, wurden bei diesem Ansatz auch keine protektiven Effekte bei dem verwendeten akuten Schädigungsmodell festgestellt. Die Neuansiedlung von KCs führte vielmehr zu einer stärkeren Leberschädigung, aufgrund der höheren Anzahl dieses Zelltyps in den Lebern der Empfängertiere. Dennoch konnte die Hypothese, dass eine Überexpression von hIL 10 vor einem hepatischen Ischämie-/Reperfusionsschaden schützt, in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Sowohl die GOT- als auch die GPT-Werte als Marker der Leberschädigung waren bei der Positivkontrolle in der hIL 10-Gruppe signifikant verringert verglichen mit den EGFP- bzw. NaCl-Kontrollen. Die histologische Auswertung zeigte ein analoges Bild mit geringerem Influx von Entzündungszellen und einer weniger starken Ausprägung von nekrotischen Arealen.

6.6 Kryokonservierung von Kupffer-Zellen

Das Einfrieren von Zellen ist bis heute die einzige geeignete Methode, um Zellen über einen längeren Zeitraum zu konservieren, da kein Zellstoffwechsel mehr möglich ist, wenn zelluläres Wasser in Eis umgewandelt wird (129). Fortschritte in dieser Technologie haben es ermöglicht, eine Reihe von Zellen zu kryokonservieren. Bei primären Leberzellen haben sich bereits zahlreiche Arbeitsgruppen mit den Einfriervorgängen v.a. von Hepatozyten und zuletzt auch von Ito-Zellen beschäftigt (174).

Bis jetzt wurden jedoch keine Studien durchgeführt, ob humane KCs kryokonserviert werden können oder nicht. Untersuchungen über eingefrorene Hepatozyten haben gezeigt, dass diese primären Leberzellen ihre Vitalität (175-178), metabolischen Eigenschaften (175; 179-181) und die Fähigkeit an Kollagen-beschichteten Kulturplatten zu adhärieren (175; 176; 180; 181) beibehalten.

Um Unterschiede in den physiologischen Eigenschaften von frischen und eingefrorenen KCs *in vitro* bestimmen zu können, müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt werden. Insbesondere muss die Überlebensrate von eingefrorenen KCs nach dem Auftauen bestimmt und die Kultivierungsprofile, die Morphologie der kultivierten Zellen und die Stimulations- und Phagozytoseeigenschaften von eingefrorenen mit frischen KCs verglichen werden. Kleine Veränderungen in den Einfrierbedingungen (z.B. Zelldichte, Einfriermedium, Abkühlrate und Lagertemperatur) können diese Faktoren jedoch hochgradig beeinflussen. Für die meisten eukaryotischen Zellen wird eine optimale Zelldichte beim Einfrieren von 10^6 bis 10^7 Zellen/ml empfohlen (182), da diese eine ausreichende Zellzahl nach dem Auftauen bereitstellt. Bezuglich des Einfriermediums wurde bei der aktuellen Studie ein Standardkulturmedium für KCs (RPMI 1640) verwendet, welches 12 % FCS und 10 % des Kryoprotektivums DMSO enthielt (129). In der Regel werden beim Einfrieren die Gefrierschutzmittel Glycerol oder DMSO in unterschiedlichen Konzentrationen, abhängig vom jeweiligen Zelltyp, der kryokonserviert werden soll, verwendet (183-186). Sie minimieren die intrazelluläre Eiskristallbildung und reduzieren dadurch das osmotische Ungleichgewicht, welches über der Zellmembran während des Einfrierprozesses entsteht. Die Abkühlrate ist ebenfalls ein bedeutender Faktor bei diesem Phänomen. Durch eine zu langsame Abkühlgeschwindigkeit bildet sich Eis hauptsächlich außerhalb der Zelle bevor die intrazelluläre Eisbildung einsetzt (187). Das Resultat hieraus ist eine ausgeprägte zelluläre Dehydrierung („Lösungseffekt“). Auf der anderen Seite führen zu schnelle Abkühlraten zu einer verstärkten intrazellulären Eisbildung, wodurch ein „mechanischer Zellschaden“ entstehen kann. Beide Effekte können die Überlebensrate der Zellen maßgeblich beeinflussen und irreversibel schädigen (188). Mit nur wenigen Ausnahmen wird deshalb eine durchschnittliche Abkühlrate von -1 °C bis -2 °C pro Minute empfohlen (129). Letztendlich spielen auch die Lagerbedingungen eine entscheidende Rolle auf die Überlebensrate und die Vitalität der Zellen nach dem Auftauen. So beeinflusst die Temperatur die mögliche Lagerperiode, nach der die Zellen wieder erfolgreich aufgetaut werden können und ihre Vita-

lität noch gewährleistet ist. Im Allgemeinen bewirken niedrigere Lagertemperaturen auch länger mögliche Lagerzeiten für die entsprechenden Zellen (129). Da mehrere Bakterien und Sporenbildende Pilze Lagertemperaturen von -60 °C bis -80 °C tolerieren, ist die Stabilität des eingefrorenen Materials nicht gesichert, wenn es nicht unterhalb von -130 °C aufbewahrt wird (189). Studien von Chesne et al. (178) haben diesbezüglich belegt, dass beispielsweise kryokonservierte Hepatozyten bis zu 4 Jahre in flüssigem Stickstoff stabil sind, wenn sie in geeigneter Weise eingefroren wurden.

6.6.1 Sowohl Ratten- als auch humane Kupffer-Zellen zeigen adäquate Überlebensraten nach der Kryokonservierung

In der vorliegenden Studie lag die Überlebensrate von Ratten-KCs bei etwa 57 % und diejenige von humanen KCs bei ca. 65 %, was bedeutet, dass im Schnitt rund 43 % der Ausgangszellzahl an Ratten-KCs und etwa 35 % der humanen KCs durch den Einfriervorgang, die Lagerung und den Auftauprozess verloren wurde. Untersuchungen der Überlebensrate von Hepatozyten haben gezeigt, dass sich der Anteil an vitalen Zellen nach dem Auftauen zwischen 40 % und 70 % befindet (177; 179; 190; 191). Vergleicht man die aktuell erhobenen Ergebnisse mit den aufgeführten Studien wird deutlich, dass eine Kryokonservierungsmethode für KCs mit einer ähnlichen Überlebensrate etabliert werden konnte. Schädliche Phänomene wie die Bildung von intrazellulärem Eis oder Lösungseffekte scheinen durch das verwendete Einfrierprogramm und durch den Zusatz des Kryoprotektivums Dimethylsulfoxid auf ein entsprechendes Minimum reduziert worden zu sein. Weiterhin haben Untersuchungen belegt, dass im Gegensatz zum Einfrierprozess, ein schneller Auftauprozess der Zellen erforderlich ist, um eine hohe Lebensfähigkeit der Zellen zu erhalten (192). Dies erscheint insofern wichtig, da das Gefrierschutzmittel DMSO bei Raumtemperatur durch Penetration in die Zellmembran zugleich potentiell zytotoxische Eigenschaften besitzt, insbesondere wenn die Zellen über eine längere Zeit mit dem Agens exponiert sind. Nach der Lagerung bei -178 °C wurden die Zellen deshalb sofort in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt und aufgetaut, die Zellsuspension mit 10 Volumenteilen vorgewärmtem Medium versetzt und danach zentrifugiert. Durch Abnahme des Überstandes und dem Resuspendieren der Zellen in frischem Kulturmedium konnte somit das verbliebene DMSO effizient entfernt werden.

6.6.2 Die Kultivierungsprofile von frischen und kryokonservierten Kupffer-Zellen sind miteinander vergleichbar

Weiterhin zeigten die kryokonservierten KCs nach dem Auftauprozess eine für diesen Makrophagentyp entsprechende Morphologie. Interessanterweise war nach 2 und 3 Tagen in Kultur eine etwas größere Anzahl an eingefrorenen KCs funktionell intakt, obwohl diese Unterschiede keine statistische Signifikanz erreichten. Durch den Verlust von weniger vitalen Zellen beim Einfrieren bzw. Auftauen, könnte bei den kryokonservierten KCs eine in gewisser Weise „selektierte“ KC-Population bestehen, die dann auch das bessere Kultivierungsprofil aufweist.

Die vorliegende Studie zeigt aber auch einen entscheidenden Nachteil auf, dass KCs im Allgemeinen nur über einen begrenzten Zeitraum kultiviert werden können. Nach den vorliegenden Ergebnissen reduzierte sich der Anteil der vitalen KCs aus der Kryo-Gruppe auf etwa 50 % der Ausgangszellzahl nach 3 Tagen in Kultur. Insgesamt betrachtet gibt es jedoch keinen signifikanten Unterschied in den Kultivierungseigenschaften zwischen frischen und kryokonservierten KCs.

6.6.3 Frische und kryokonservierte Kupffer-Zellen unterscheiden sich nicht in ihrem Stimulationsverhalten

Die Stimulation mit LPS, einem Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, führt zur Aktivierung von KCs und daraus resultierend zur Sekretion von Zytokinen wie IL 6 oder TNF α (29,30). Die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und deren Freisetzung ist ein wichtiger Schritt in der Akutphaseantwort der Zellen und der Aufrechterhaltung von entzündlichen Prozessen. In der aktuellen Untersuchung fanden sich sowohl die Zytokin-Grundspiegel als auch die Konzentrationen nach der Stimulation mit LPS von frischen und eingefrorenen KCs untereinander vergleichbar, jeweils bezogen auf die mit PBS behandelten Kontroll-KCs. Die Ergebnisse verdeutlichen erneut, dass kryokonservierte KCs nach dem Auftauen funktionell intakt sind, da u.a. die Aktivierung von KCs durch LPS und die daraus resultierende Freisetzung von Zytokinen über eine komplexe Signalkaskade vermittelt wird, welche die Interaktion von LPS mit dem CD 14/TLR 4-Komplex auf der Oberfläche der Makrophagen und die Induktion von verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden einschließt (193; 194).

6.6.4 Frische und kryokonservierte Kupffer-Zellen zeigen keine Unterschiede in ihren Phagozytoseeigenschaften

Die Phagozytose ist ein bedeutender Prozess *in vivo* u.a. für den Gewebeumbau, das Entfernen von alternden Zellen und stellt eines der ersten Mittel des Immunsystems dar, gegen einwandernde Mikroorganismen vorzugehen. Für den Vorgang der Phagozytose sind hauptsächlich 3 verschiedene Arten von Rezeptoren mitverantwortlich, wie z.B. die Komplement- und Fc-Rezeptoren, die u.a. durch Opsonierung markierte, einwandernde Bakterien oder Pilze erkennen. Opsonine sind körpereigene Stoffe, die durch Anlagerung an körperfremdes Material dessen Phagozytose begünstigen und so v.a. der Infektionsabwehr dienen. Dazu gehören Antikörper (= Immunglobuline wie IgG u.IgM), Faktoren des Komplementsystems (v.a. C3b), Fibronectin sowie C5 und Faktor B. Ein weiterer Rezeptortyp sind die sogenannten „Scavenger-Rezeptoren“, die körperfremde Materialien wie Mikroben direkt erkennen. Durch die Bindung an diesem Rezeptor und dessen Stimulation erfolgt die Internalisierung von großen Teilen der Plasmamembran (130). Das Aktin-Grundgerüst vermittelt diesen Polymerisationsmechanismus und dadurch auch die Aufnahme von Partikeln, wie die in der aktuellen Untersuchung verwendeten opsonierten und Fluoreszenz-markierten Latex-Beads.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass frische und kryokonservierte KCs nach 24-stündiger Inkubation mit opsonierten Latex-Beads vergleichbare Phagozytoseraten aufwiesen. Weiterhin wurden in der Analyse der Fluoreszenzintensität, welche für die Anzahl aufgenommener Latex-Beads pro Zelle steht, ebenfalls keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Diese Ergebnisse veranschaulichen wiederum, dass das verwendete Protokoll einen schonenden Einfriervorgang ermöglicht und die KCs keinen erkennbaren Schaden durch den Prozess erhalten.

Die in der vorliegenden Studie erhaltenen Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die beschriebene Methode eine einfache Möglichkeit bietet, KCs über eine längere Periode zu konservieren. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede in komplexen Prozessen wie der Phagozytose oder der Zytokinexpression nach Stimulation der Zellen beobachtet. Bei Bedarf könnten die Zellen wieder aufgetaut, *in vitro* genetisch verändert und wie in unserem Ansatz als therapeutisches Agens bei verschiedenen Lebererkrankungen im Sinne eines „drug-targetings“ eingesetzt werden.

7 Zusammenfassung

Die Aktivierung von KCs, den lokalen Gewebsmakrophagen der Leber, spielt eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese zahlreicher, inflammatorischer Lebererkrankungen. Hierbei ist dieser Zelltyp, durch die Interaktion mit anderen hepatischen Zellen u.a. über die Expression physiologisch aktiver Substanzen, sowohl direkt als auch indirekt an der lokalen Gewebeschädigung beteiligt. Zur weiterführenden Charakterisierung dieser Beteiligung und der pathophysiologischen Folgen der Zellaktivierung wurden KCs in einem akuten Schädigungsmodell der Leber (Ischämie-Reperfusionsmodell) der Ratte transplantiert. Dieses Tiermodell imitiert die Organschädigung wie sie beispielsweise bei Lebertransplantationen bzw. Leberteilresektionen auftritt. Dabei wurden transduzierte KCs eingesetzt, die nach adenoviralem Gentransfer und Transplantation in den Empfänger spezifische Genprodukte (hier hIL 10) vermehrt in der Leber exprimieren. IL 10 wird als eines der wichtigsten anti-inflammatorischen Zytokine im Organismus betrachtet, da es u.a. effizient die Produktion von pro-inflammatorischen Mediatoren wie IL 6 oder TNF α inhibiert und somit das gestörte Gleichgewicht zwischen entzündungsfördernden und -hemmenden Mediatoren bei inflammatorischen Prozessen wieder reguliert. Nach dieser Theorie sollte die Transplantation und Repopulation von KCs, die mit Ad5.hIL 10 transduziert wurden, einen protektiven Effekt bei dieser Leberschädigung vermitteln. Durch eine Microarray Analyse konnte in einem Vorversuch bereits die Hochregulation des IL 10-Signalkaskadewegs in einer KC-Population aus zirrhotischem Lebergewebe festgestellt werden, was als eine Art protektive Gegenregulation des Organismus betrachtet werden kann. Weiterhin konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* demonstriert werden, dass KCs mit den verwendeten adenoviralen Konstrukten infiziert werden. Beim Modell der Repopulation der genetisch veränderten KCs konnte das Transgen in den Empfängerlebern nur auf RNA-Ebene nachgewiesen werden, was prinzipiell auf eine funktionelle Integrität der transplantierten KCs schließen lässt. Der Nachweis des Transgens auf Proteinebene war jedoch mittels ELISA bzw. Western Blot nicht erfolgreich, was u.a. mit der geringeren Sensitivität der Proteinnachweismethoden bzw. mit einer zu geringen Einschleuflung des Transgens in die Leber erklärt werden kann. Vermutlich deshalb wurden in einem akuten Schädigungsmodell auch keine protektiven Effekte durch die Repopulation von mit hIL 10-adenovirale transduzierten KCs beobachtet. Die

Repopulation von KCs führte vielmehr zu einem höheren Anstieg der Lebertransaminasen als Zeichen einer verstärkten Leberschädigung. Die protektiven Eigenschaften von hIL 10 konnten allerdings in den entsprechenden Positiv-Kontrollen gezeigt werden. Insgesamt betrachtet bleibt die Transplantation von Leberzellen eine vielversprechende alternative Strategie bei der Behandlung von zahlreichen Lebererkrankungen. Eine erfolgreiche Etablierung dieser Methode könnte eine neue Therapieform darstellen und den Bedarf an Spenderlebern reduzieren. In der vorliegenden Studie wurden weitere Grundlagen auf diesem Gebiet geschaffen, die in der Zukunft noch im Detail erforscht werden müssen.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Arteria
Abb	Abbildung
Ad	Adenovirus
ADCC	<i>antibody-dependent cell mediated cytotoxicity</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ALT = GPT	Alanin Aminotransferase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AST = GOT	Aspartat Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BLVRA	Biliverdinreduktase
B-TCGF	<i>B cell-derived T cell growth factor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
c-fos	Zelluläres fos
c-jun	Zelluläres jun
c-myc	Zelluläres myc
CPR	Cytochrom P450 Reduktase
CSIF	<i>cytokine synthesis inhibitory factor</i>
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ESTs	<i>expressed sequence tags</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
ffu	<i>fluorescence forming units</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FS	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
G	Gauge

GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage-colony stimulating factor</i>
h	Stunde
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HO	Hämoxigenase
HO [·]	Hydroxylradikal
HO ₂ [·]	Perhydroxylradikal
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSP	Hitzeschockprotein
I/R	Ischämie/Reperfusion
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IVC	<i>inferior vena cava</i>
IκB	<i>inhibitory κB</i>
JAK	Janus Kinase
Kb	Kilobase
KCs	Kupffer-Zelle
kDa	Kilodalton
LC	Light Cycler
LPS	Lipopolysaccharid
LTX	Lebertransplantation
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
M-CSF	<i>macrophage-colony stimulating factor</i>
M-CSF	mast cell growth factor
MGB	<i>minor groove binder</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MMF	Mycophenolat Mofetil
MMP	Matrix Metalloproteinase
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
NF-AT	<i>nuclear factor activating T-cell</i>

NF _κ B	<i>nuclear factor κB</i> (Nuklearer Faktor κB)
NPCs	nicht parenchymale Zellen
O ₂ [·]	Superoxidradikal
OLT	<i>orthotopic liver transplantation</i>
PAF	<i>platelet activating factor</i>
PBS	<i>phosphate buffered salt solution</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PCs	parenchymale Zellen
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PE	R-Phycoerythrin
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
S	Seite
SBEs	<i>STAT binding elements</i>
SD	Sprague Dawley
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	<i>Src homology 2</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
SOD	Superoxiddismutase
SS	sideward scatter (Seitwärtsstreulicht)
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
Tab	Tabelle
TAE	Tris-acetate/EDTA electrophoresis buffer
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor

Tris	Trihydroxymethylaminomethan
TX	Transplantation
TYK	Tyrosinkinase
UDP	Uridindiphosphat
V	Vena
XD	Xanthindehydrogenase
XO	Xanthinoxidase
ZnPP	Zink-Protoporphyrin

9 Literaturverzeichnis

1. **Ehrnsperger A.** *Transkriptionelle Regulation von MADDAM/ADAM 19* (Dissertation). Regensburg. 2004.
2. **Janeway C and Travers P.** *Immunobiology*. New York: Garland Publishing, 2001.
3. **Fanger MW, Shen L, Graziano RF and Guyre PM.** Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. *Immunol Today* 10: 92-99, 1989.
4. **Boyd E.** Normal variability in weight of the human adult liver and spleen. *Archives of Pathology* 16: 1933.
5. **Faller A.** *Der Körper des Menschen*. Stuttgart: Georg Thieme, 1995.
6. **Wehner R and Gehring W.** *Zoologie*. Stuttgart: Georg Thieme, 1990.
7. **Pschyrembl W.** *Klinisches Wörterbuch*. Berlin: de Gruyter, 1998.
8. **Drenckhahn D, Fahimi D and Fleischhauer K.** *Leber und Gallenblase*. München: Urban; Schwarzenberg, 1994.
9. **Gupta SC, Gupta CD and Gupta SB.** Hepatovenous segments in the human liver. *J Anat* 133: 1-6, 1981.
10. **Dawson JR, Adams DJ and Wolf CR.** Induction of drug metabolizing enzymes in human liver cell line Hep G2. *FEBS Lett* 183: 219-222, 1985.
11. **Töndury G.** *Angewandte und topographische Anatomie*. Stuttgart: Georg Thieme, 1981.
12. **Gerok W.** *Hepatologie*. München: Urban; Schwarzenberg, 1995.
13. **De Leeuw AM, Brouwer A and Knook DL.** Sinusoidal endothelial cells of the liver: fine structure and function in relation to age. *J Electron Microsc Tech* 14: 218-236, 1990.
14. **Wake K, Decker K, Kirn A, Knook DL, McCuskey RS, Bouwens L and Wisse E.** Cell biology and kinetics of Kupffer cells in the liver. *Int Rev Cytol* 118: 173-229, 1989.
15. **Kawada N, Klein H and Decker K.** Eicosanoid-mediated contractility of hepatic stellate cells. *Biochem J* 285 (Pt 2): 367-371, 1992.

16. **Wisse E, Luo D, Vermijlen D, Kanellopoulou C, De Zanger R and Braet F.** On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells. *Semin Liver Dis* 17: 265-286, 1997.
17. **Voet D and Voet JG.** *Biochemie*. Weinheim: VCH, 1994.
18. **Jungermann K.** Dynamics of zonal hepatocyte heterogeneity. Perinatal development and adaptive alterations during regeneration after partial hepatectomy, starvation and diabetes. *Acta Histochem Suppl* 32: 89-98, 1986.
19. **Visser TJ.** Role of sulfation in thyroid hormone metabolism. *Chem Biol Interact* 92: 293-303, 1994.
20. **Seki S, Habu Y, Kawamura T, Takeda K, Dobashi H, Ohkawa T and Hiraide H.** The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunol Rev* 174: 35-46, 2000.
21. **Bargmann W.** *Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Stuttgart: Georg Thieme, 1967.
22. **Glue P and Clement RP.** Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism-basic concepts and methods of assessment. *Cell Mol Neurobiol* 19: 309-323, 1999.
23. **Elias JA, Freundlich B, Kern JA and Rosenbloom J.** Cytokine networks in the regulation of inflammation and fibrosis in the lung. *Chest* 97: 1439-1445, 1990.
24. **Floege J, Eng E, Young BA and Johnson RJ.** Factors involved in the regulation of mesangial cell proliferation in vitro and in vivo. *Kidney Int Suppl* 39: S47-S54, 1993.
25. **Gressner AM.** Hepatic fibrogenesis: the puzzle of interacting cells, fibrogenic cytokines, regulatory loops, and extracellular matrix molecules. *Z Gastroenterol* 30 Suppl 1: 5-16, 1992.
26. **Kovacs EJ and DiPietro LA.** Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J* 8: 854-861, 1994.
27. **Ross R.** Mechanisms of atherosclerosis-a review. *Adv Nephrol Necker Hosp* 19: 79-86, 1990.
28. **Schuppan D, Hahn EG and Riecken EO.** [Changes in connective tissue metabolism in alcohol-induced liver fibrosis]. *Z Gastroenterol* 26 Suppl 3: 28-38, 1988.
29. **Schuster HP, Lydtin H, Wilms K, and Lindner UK.** *Der Internist*. 1308-1322. Springer, 1999.

30. **Angus DC, Clermont G, Kramer DJ, Linde-Zwirble WT and Pinsky MR.** Short-term and long-term outcome prediction with the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II system after orthotopic liver transplantation. *Crit Care Med* 28: 150-156, 2000.
31. **First MR.** Transplantation in the nineties. *Transplantation* 53: 1-11, 1992.
32. **Edwards EB, Roberts JP, McBride MA, Schulak JA and Hunsicker LG.** The effect of the volume of procedures at transplantation centers on mortality after liver transplantation. *N Engl J Med* 341: 2049-2053, 1999.
33. **Otte JB.** Recent developments in liver transplantation. Lessons from a 5-year experience. *J Hepatol* 12: 386-393, 1991.
34. **Bismuth H, Castaing D, Ericzon BG, Otte JB, Rolles K, Ringe B and Sloof M.** Hepatic transplantation in Europe. First Report of the European Liver Transplant Registry. *Lancet* 2: 674-676, 1987.
35. **Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS and Waddel WR.** HOMOTRANSPLANTATION OF THE LIVER IN HUMANS. *Surg Gynecol Obstet* 117: 659-676, 1963.
36. **Keeffe EB.** Liver transplantation at the millennium. Past, present, and future. *Clin Liver Dis* 4: 241-255, 2000.
37. **Gürtgemann A, Schievers KH, Esser G, Lee TS, Paquet KJ and Kaufer C.** Erfahrungsbericht über eine homologe Lebertransplantation. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1713-1717, 1969.
38. **Starzl TE, Iwatsuki S, Van Thiel DH, Gartner JC, Zitelli BJ, Malatack JJ, Schade RR, Shaw BW, Jr., Hakala TR, Rosenthal JT and Porter KA.** Evolution of liver transplantation. *Hepatology* 2: 614-636, 1982.
39. **Calne RY.** Immunosuppression for organ grafting. *Int J Immunopharmacol* 1: 163-164, 1979.
40. **Denton MD, Magee CC and Sayegh MH.** Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* 353: 1083-1091, 1999.
41. **Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataraman R and Jain A.** FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet* 2: 1000-1004, 1989.

42. **Klupp J, Bechstein WO, Platz KP, Keck H, Lemmens HP, Knoop M, Langrehr JM, Neuhaus R, Pratschke J and Neuhaus P.** Mycophenolate mofetil added to immunosuppression after liver transplantation--first results. *Transpl Int* 10: 223-228, 1997.
43. **Watson CJ, Friend PJ, Jamieson NV, Frick TW, Alexander G, Gimson AE and Calne R.** Sirolimus: a potent new immunosuppressant for liver transplantation. *Transplantation* 67: 505-509, 1999.
44. **Starzl TE, Iwatsuki S, Esquivel CO, Todo S, Kam I, Lynch S, Gordon RD and Shaw BW, Jr.** Refinements in the surgical technique of liver transplantation. *Semin Liver Dis* 5: 349-356, 1985.
45. **Verran DJ, Asfar SK, Ghent CN, Grant DR and Wall WJ.** Biliary reconstruction without T tubes or stents in liver transplantation: report of 502 consecutive cases. *Liver Transpl Surg* 3: 365-373, 1997.
46. **Emre S, Schwartz ME, Altaca G, Sethi P, Fiel MI, Guy SR, Kelly DM, Sebastian A, Fisher A, Eickmeyer D, Sheiner PA and Miller CM.** Safe use of hepatic allografts from donors older than 70 years. *Transplantation* 62: 62-65, 1996.
47. **Raia S, Nery JR and Mies S.** Liver transplantation from live donors. *Lancet* 2: 497, 1989.
48. **Lo CM, Fan ST, Liu CL, Wei WI, Lo RJ, Lai CL, Chan JK, Ng IO, Fung A and Wong J.** Adult-to-adult living donor liver transplantation using extended right lobe grafts. *Ann Surg* 226: 261-269, 1997.
49. **Marcos A, Ham JM, Fisher RA, Olzinski AT and Posner MP.** Single-center analysis of the first 40 adult-to-adult living donor liver transplants using the right lobe. *Liver Transpl* 6: 296-301, 2000.
50. **Keeffe EB.** Liver transplantation: current status and novel approaches to liver replacement. *Gastroenterology* 120: 749-762, 2001.
51. **Grompe M.** Liver repopulation for the treatment of metabolic diseases. *J Inherit Metab Dis* 24: 231-244, 2001.
52. **Dancygier H.** *Klinische Hepatologie*. Berlin: Springer Verlag, 2003.
53. **Gasbarrini A, Borle AB, Farghali H, Bender C, Francavilla A and Van Thiel D.** Effect of anoxia on intracellular ATP, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, and cytotoxicity in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 267: 6654-6663, 1992.

54. **Belzer FO and Southard JH.** Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 45: 673-676, 1988.
55. **Hansen TN, Dawson PE and Brockbank KG.** Effects of hypothermia upon endothelial cells: mechanisms and clinical importance. *Cryobiology* 31: 101-106, 1994.
56. **Woods HF and Krebs HA.** Lactate production in the perfused rat liver. *Biochem J* 125: 129-139, 1971.
57. **Lemasters JJ, DiGuiseppi J, Nieminen AL and Herman B.** Blebbing, free Ca²⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* 325: 78-81, 1987.
58. **Bzeizi KI, Dawkes R, Dodd NJ, Plevris JN and Hayes PC.** Graft dysfunction following liver transplantation: role of free radicals. *J Hepatol* 26: 69-74, 1997.
59. **Stirpe F and Della CE.** The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 244: 3855-3863, 1969.
60. **Della CE, Gozzetti G, Novello F and Stirpe F.** Properties of the xanthine oxidase from human liver. *Biochim Biophys Acta* 191: 164-166, 1969.
61. **Marzi I, Zhi ZN, Zimmermann FA, Lemasters JJ and Thurman RG.** Xanthine and hypoxanthine accumulation during storage may contribute to reperfusion injury following liver transplantation in the rat. *Transplant Proc* 21: 1319-1320, 1989.
62. **Engerson TD, McKelvey TG, Rhyne DB, Boggio EB, Snyder SJ and Jones HP.** Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *J Clin Invest* 79: 1564-1570, 1987.
63. **Yokoyama Y, Beckman JS, Beckman TK, Wheat JK, Cash TG, Freeman BA and Parks DA.** Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am J Physiol* 258: G564-G570, 1990.
64. **Pardini RS.** Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. *Arch Insect Biochem Physiol* 29: 101-118, 1995.
65. **Kurokawa T and Takagi H.** Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 31: 1775-1776, 1999.

66. **McCord JM**. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163, 1985.
67. **Del Maestro RF**. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl* 492: 153-168, 1980.
68. **Shiratori Y, Kiriya H, Fukushi Y, Nagura T, Takada H, Hai K and Kamii K**. Modulation of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury by Kupffer cells. *Dig Dis Sci* 39: 1265-1272, 1994.
69. **Jaeschke H and Farhood A**. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 260: G355-G362, 1991.
70. **Koo A, Komatsu H, Tao G, Inoue M, Guth PH and Kaplowitz N**. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology* 15: 507-514, 1992.
71. **Clavien PA, Harvey PR and Strasberg SM**. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 53: 957-978, 1992.
72. **Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, Bauer I and Zhang JX**. Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock* 8: 80-85, 1997.
73. **Froh M, Wheeler MD, Smutney O, Zhong Z, Bradford BU and Thurman RG**. New method of delivering gene-altered Kupffer cells to rat liver: studies in an ischemia-reperfusion model. *Gastroenterology* 124: 172-183, 2003.
74. **Opal SM and DePalo VA**. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117: 1162-1172, 2000.
75. **Bogdan C, Vodovotz Y and Nathan C**. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 174: 1549-1555, 1991.
76. **Cenci E, Romani L, Mencacci A, Spaccapelo R, Schiaffella E, Puccetti P and Bistoni F**. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. *Eur J Immunol* 23: 1034-1038, 1993.
77. **Niilo H, Otsuka T, Kuga S, Nemoto Y, Abe M, Hara N, Nakano T, Ogo T and Niho Y**. IL-10 inhibits prostaglandin E2 production by lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *Int Immunol* 6: 661-664, 1994.

78. **Willems F, Marchant A, Delville JP, Gerard C, Delvaux A, Velu T, de Boer M and Goldman M.** Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol* 24: 1007-1009, 1994.
79. **Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Burdick MD and Kunkel SL.** Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J Immunol* 152: 3559-3569, 1994.
80. **Wang P, Wu P, Anthes JC, Siegel MI, Egan RW and Billah MM.** Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils. *Blood* 83: 2678-2683, 1994.
81. **Knolle P, Schlaak J, Uhrig A, Kempf P, Meyer zum Buschenfelde KH and Gerken G.** Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol* 22: 226-229, 1995.
82. **Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, Miao L, Fogt F, Matsumoto H, Tahan SR and Su GL.** Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 30: 934-943, 1999.
83. **Finbloom DS and Winestock KD.** IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol* 155: 1079-1090, 1995.
84. **Ho AS, Wei SH, Mui AL, Miyajima A and Moore KW.** Functional regions of the mouse interleukin-10 receptor cytoplasmic domain. *Mol Cell Biol* 15: 5043-5053, 1995.
85. **Lee TS and Chau LY.** Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* 8: 240-246, 2002.
86. **Moore KW, de Waal MR, Coffman RL and O'Garra A.** Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683-765, 2001.
87. **Yin MJ, Yamamoto Y and Gaynor RB.** The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 396: 77-80, 1998.
88. **Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB and Baldwin AS, Jr.** Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem* 274: 31868-31874, 1999.
89. **Fujita H.** Molecular mechanism of heme biosynthesis. *Tohoku J Exp Med* 183: 83-99, 1997.

90. **Choi AM and Alam J.** Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 9-19, 1996.
91. **Maines MD.** The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-554, 1997.
92. **McCoubrey WK, Jr., Huang TJ and Maines MD.** Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 247: 725-732, 1997.
93. **Maines MD.** Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 2: 2557-2568, 1988.
94. **Takahashi S, Takahashi Y, Ito K, Nagano T, Shibahara S and Miura T.** Positive and negative regulation of the human heme oxygenase-1 gene expression in cultured cells. *Biochim Biophys Acta* 1447: 231-235, 1999.
95. **Kudo S and Kawano K.** Role of interleukin-1beta in the modulations of cytochrome P450 and heme metabolism in rat liver. *J Interferon Cytokine Res* 19: 601-607, 1999.
96. **Rizzardini M, Terao M, Falciani F and Cantoni L.** Cytokine induction of haem oxygenase mRNA in mouse liver. Interleukin 1 transcriptionally activates the haem oxygenase gene. *Biochem J* 290 (Pt 2): 343-347, 1993.
97. **Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR and Callahan KS.** Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am J Physiol* 274: H883-H891, 1998.
98. **Pellacani A, Wiesel P, Sharma A, Foster LC, Huggins GS, Yet SF and Perrella MA.** Induction of heme oxygenase-1 during endotoxemia is downregulated by transforming growth factor-beta1. *Circ Res* 83: 396-403, 1998.
99. **Camhi SL, Alam J, Otterbein L, Sylvester SL and Choi AM.** Induction of heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13: 387-398, 1995.
100. **Taylor JL, Carraway MS and Piantadosi CA.** Lung-specific induction of heme oxygenase-1 and hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 274: L582-L590, 1998.

101. **Vesely MJ, Exon DJ, Clark JE, Foresti R, Green CJ and Motterlini R.** Heme oxygenase-1 induction in skeletal muscle cells: hemin and sodium nitroprusside are regulators in vitro. *Am J Physiol* 275: C1087-C1094, 1998.
102. **Immenschuh S, Iwahara S, Satoh H, Nell C, Katz N and Muller-Eberhard U.** Expression of the mRNA of heme-binding protein 23 is coordinated with that of heme oxygenase-1 by heme and heavy metals in primary rat hepatocytes and hepatoma cells. *Biochemistry* 34: 13407-13411, 1995.
103. **Shibahara S, Muller RM and Taguchi H.** Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem* 262: 12889-12892, 1987.
104. **Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, Kitajima M, Makino N, Ishimura Y and Suematsu M.** Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res* 85: 663-671, 1999.
105. **Liu Y and Ortiz de Montellano PR.** Reaction intermediates and single turnover rate constants for the oxidation of heme by human heme oxygenase-1. *J Biol Chem* 275: 5297-5307, 2000.
106. **Poss KD and Tonegawa S.** Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10919-10924, 1997.
107. **Otterbein LE and Choi AM.** Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1029-L1037, 2000.
108. **Otterbein LE, Mantell LL and Choi AM.** Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 276: L688-L694, 1999.
109. **Sato K, Balla J, Otterbein L, Smith RN, Brouard S, Lin Y, Csizmadia E, Sevigny J, Robson SC, Vercellotti G, Choi AM, Bach FH and Soares MP.** Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J Immunol* 166: 4185-4194, 2001.
110. **Snyder SH and Baranano DE.** Heme oxygenase: a font of multiple messengers. *Neuropsychopharmacology* 25: 294-298, 2001.
111. **Smedsrød B and Pertoft H.** Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in high yield from a single rat liver by means of Percoll centrifugation and selective adherence. *J Leukoc Biol* 38: 213-230, 1985.

112. **Froh M, Konno A, Thurman G.** Isolation of liver Kupffer cells. Current Protocols in Toxicology, Wiley.2002- Nov:2 (2): 14.4.1/14.4.12
113. **Weiss TS, Pahernik S, Scheruebl I, Jauch KW and Thasler WE.** Cellular damage to human hepatocytes through repeated application of 5-aminolevulinic acid. *J Hepatol* 38: 476-482, 2003.
114. **Graham FL and Prevec L.** Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol Biotechnol* 3: 207-220, 1995.
115. **Arthur JF, Butterfield LH, Roth MD, Bui LA, Kiertscher SM, Lau R, Dubinett S, Glaspy J, McBride WH and Economou JS.** A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. *Cancer Gene Ther* 4: 17-25, 1997.
116. **Mullis KB and Falooona FA.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350, 1987.
117. **Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA.** Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166, 1986.
118. **Chensue SW, Terebuh PD, Remick DG, Scales WE and Kunkel SL.** Invivo Biologic and Immunohistochemical Analysis of Interleukin-1 Alpha, Beta and Tumor-Necrosis-Factor During Experimental Endotoxemia - Kinetics, Kupffer Cell Expression, and Glucocorticoid Effects. *American Journal of Pathology* 138: 395-402, 1991.
119. **Ogle CK, Wu JZ, Mao X, Szczer K, Alexander JW and Ogle JD.** Heterogeneity of Kupffer cells and splenic, alveolar, and peritoneal macrophages for the production of TNF, IL-1, and IL-6. *Inflammation* 18: 511-523, 1994.
120. **Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM and Campbell DA, Jr.** Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 85: 1936-1943, 1990.
121. **Colletti LM, Cortis A, Lukacs N, Kunkel SL, Green M and Strieter RM.** Tumor necrosis factor up-regulates intercellular adhesion molecule 1, which is important in the neutrophil-dependent lung and liver injury associated with hepatic ischemia and reperfusion in the rat. *Shock* 10: 182-191, 1998.

122. **Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z and Spitzer JJ.** Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats. *J Leukoc Biol* 52: 377-382, 1992.
123. **Jaeschke H, Smith CV and Mitchell JR.** Reactive oxygen species during ischemia-reflow injury in isolated perfused rat liver. *J Clin Invest* 81: 1240-1246, 1988.
124. **Wheeler MD, Kono H, Yin M, Rusyn I, Froh M, Connor HD, Mason RP, Samulski RJ and Thurman RG.** Delivery of the Cu/Zn-superoxide dismutase gene with adenovirus reduces early alcohol-induced liver injury in rats. *Gastroenterology* 120: 1241-1250, 2001.
125. **Wheeler MD, Yamashina S, Froh M, Rusyn I and Thurman RG.** Adenoviral gene delivery can inactivate Kupffer cells: role of oxidants in NF-kappaB activation and cytokine production. *J Leukoc Biol* 69: 622-630, 2001.
126. **Worgall S, Singh R, Leopold PL, Kaner RJ, Hackett NR, Topf N, Moore MA and Crystal RG.** Selective expansion of alveolar macrophages in vivo by adenovirus-mediated transfer of the murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor cDNA. *Blood* 93: 655-666, 1999.
127. **De Nichilo MO and Yamada KM.** Integrin alpha v beta 5-dependent serine phosphorylation of paxillin in cultured human macrophages adherent to vitronectin. *J Biol Chem* 271: 11016-11022, 1996.
128. **Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ and Lentsch AB.** Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. *Hepatology* 30: 203-208, 1999.
129. **Simione FP.** *Cryopreservation Manual (Nalge Nunc International).* [Online]. 1998. <http://www.ehso.emory.edu/Forms/cryo.pdf>
130. **Muller CD and Schuber F.** Fate of ecto-NAD⁺ glycohydrolase during phagocytosis of normal and mannosylated latex beads by murine macrophages. *Biol Cell* 68: 57-64, 1990.
131. **Koop DR, Klopfenstein B, Iimuro Y and Thurman RG.** Gadolinium chloride blocks alcohol-dependent liver toxicity in rats treated chronically with intragastric alcohol despite the induction of CYP2E1. *Mol Pharmacol* 51: 944-950, 1997.
132. **Stachlewitz RF, Seabra V, Bradford B, Bradham CA, Rusyn I, Germolec D and Thurman RG.** Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells. *Hepatology* 29: 737-745, 1999.

133. **Bremer C, Bradford BU, Hunt KJ, Knecht KT, Connor HD, Mason RP and Thurman RG.** Role of Kupffer cells in the pathogenesis of hepatic reperfusion injury. *Am J Physiol* 267: G630-G636, 1994.
134. **Schemmer P, Bradford BU, Rose ML, Bunzendahl H, Raleigh JA, Lemasters JJ and Thurman RG.** Intravenous glycine improves survival in rat liver transplantation. *Am J Physiol* 276: G924-G932, 1999.
135. **Branster MV and Morton RK.** Isolation of intact liver cells. *Nature* 180: 1283-1284, 1957.
136. **Alpini G, Lenzi R, Zhai WR, Liu MH, Slott PA, Paronetto F and Tavoloni N.** Isolation of a nonparenchymal liver cell fraction enriched in cells with biliary epithelial phenotypes. *Gastroenterology* 97: 1248-1260, 1989.
137. **Munthe-Kaas AC, Berg T, Seglen PO and Seljelid R.** Mass isolation and culture of rat kupffer cells. *J Exp Med* 141: 1-10, 1975.
138. **Morin O, Patry P and Lafleur L.** Heterogeneity of endothelial cells of adult rat liver as resolved by sedimentation velocity and flow cytometry. *J Cell Physiol* 119: 327-334, 1984.
139. **Praaning-Van Dalen DP and Knook DL.** Quantitative determination of in vivo endocytosis by rat liver Kupffer and endothelial cells facilitated by an improved cell isolation method. *FEBS Lett* 141: 229-232, 1982.
140. **Malhi H and Gupta S.** Hepatocyte transplantation: new horizons and challenges. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 8: 40-50, 2001.
141. **Roser B.** The distribution of intravenously injected Kupffer cells in the mouse. *J Reticuloendothel Soc* 5: 455-471, 1968.
142. **Malhi H, Irani AN, Vollenberg I, Schilsky ML and Gupta S.** Early cell transplantation in LEC rats modeling Wilson's disease eliminates hepatic copper with reversal of liver disease. *Gastroenterology* 122: 438-447, 2002.
143. **Borel JF, Feurer C, Gubler HU and Stahelin H.** Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6: 468-475, 1976.
144. **Margreiter R, Huber C, Spielberger M and Konig P.** Cyclosporine in the treatment of acute cadaveric kidney graft rejection refractory to high-dose methylprednisolone. *Transplantation* 36: 203-204, 1983.

145. **Rao A.** NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today* 15: 274-281, 1994.
146. **Jain J, Loh C and Rao A.** Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 7: 333-342, 1995.
147. **Towner RA, Reinke LA, Janzen EG and Yamashiro S.** In vivo magnetic resonance imaging study of Kupffer cell involvement in CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 72: 441-446, 1994.
148. **Ishiyama H, Ogino K and Hobara T.** Role of Kupffer cells in rat liver injury induced by diethyldithiocarbamate. *Eur J Pharmacol* 292: 135-141, 1995.
149. **Laskin DL, Gardner CR, Price VF and Jollow DJ.** Modulation of macrophage functioning abrogates the acute hepatotoxicity of acetaminophen. *Hepatology* 21: 1045-1050, 1995.
150. **Liu P, McGuire GM, Fisher MA, Farhood A, Smith CW and Jaeschke H.** Activation of Kupffer cells and neutrophils for reactive oxygen formation is responsible for endotoxin-enhanced liver injury after hepatic ischemia. *Shock* 3: 56-62, 1995.
151. **Adachi, Y., Bradford, B. U., Gao, W., Bojes, H. K., and Thurman, R. G.** Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* 20(2), 453-460. 1994.
152. **Pillai S and Bikle DD.** Lanthanum influx into cultured human keratinocytes: effect on calcium flux and terminal differentiation. *J Cell Physiol* 151: 623-629, 1992.
153. **Roland CR, Naziruddin B, Mohanakumar T and Flye MW.** Gadolinium blocks rat Kupffer cell calcium channels: relevance to calcium-dependent prostaglandin E2 synthesis and septic mortality. *Hepatology* 29: 756-765, 1999.
154. **Husztik E, Lazar G and Parducz A.** Electron microscopic study of Kupffer-cell phagocytosis blockade induced by gadolinium chloride. *Br J Exp Pathol* 61: 624-630, 1980.
155. **Roland CR, Mangino MJ, Duffy BF and Flye MW.** Lymphocyte suppression by Kupffer cells prevents portal venous tolerance induction: a study of macrophage function after intravenous gadolinium. *Transplantation* 55: 1151-1158, 1993.
156. **Hardonk MJ, Dijkhuis FW, Hulstaert CE and Koudstaal J.** Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J Leukoc Biol* 52: 296-302, 1992.

157. **Shackel NA, Gorrell MD and McCaughan GW.** Gene array analysis and the liver. *Hepatology* 36: 1313-1325, 2002.
158. **Shackel NA, McGuinness PH, Abbott CA, Gorrell MD and McCaughan GW.** Insights into the pathobiology of hepatitis C virus-associated cirrhosis: analysis of intrahepatic differential gene expression. *Am J Pathol* 160: 641-654, 2002.
159. **Shackel NA, McGuinness PH, Abbott CA, Gorrell MD and McCaughan GW.** Identification of novel molecules and pathogenic pathways in primary biliary cirrhosis: cDNA array analysis of intrahepatic differential gene expression. *Gut* 49: 565-576, 2001.
160. **Honda M, Kawai H, Shirota Y, Yamashita T and Kaneko S.** Differential gene expression profiles in stage I primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 100: 2019-2030, 2005.
161. **Honda M, Kaneko S, Kawai H, Shirota Y and Kobayashi K.** Differential gene expression between chronic hepatitis B and C hepatic lesion. *Gastroenterology* 120: 955-966, 2001.
162. **Seth D, Leo MA, McGuinness PH, Lieber CS, Brennan Y, Williams R, Wang XM, McCaughan GW, Gorrell MD and Haber PS.** Gene expression profiling of alcoholic liver disease in the baboon (*Papio hamadryas*) and human liver. *Am J Pathol* 163: 2303-2317, 2003.
163. **Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, Ganey PE and Roth RA.** Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol* 139: 213-226, 1996.
164. **Uesugi T, Froh M, Arteel GE, Bradford BU, Gabele E, Wheeler MD and Thurman RG.** Delivery of IkappaB superrepressor gene with adenovirus reduces early alcohol-induced liver injury in rats. *Hepatology* 34: 1149-1157, 2001.
165. **Fechner H, Haack A, Wang H, Wang X, Eizema K, Pauschinger M, Schoemaker R, Veghel R, Houtsmuller A, Schultheiss HP, Lamers J and Poller W.** Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther* 6: 1520-1535, 1999.
166. **Mohr L, Shankara S, Yoon SK, Krohne TU, Geissler M, Roberts B, Blum HE and Wands JR.** Gene therapy of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo in nude mice by adenoviral transfer of the *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase gene. *Hepatology* 31: 606-614, 2000.

167. **Philpott NJ, Nociari M, Elkon KB and Falck-Pedersen E.** Adenovirus-induced maturation of dendritic cells through a PI3 kinase-mediated TNF-alpha induction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6200-6205, 2004.
168. **Lehmann TG, Wheeler MD, Schwabe RF, Connor HD, Schoonhoven R, Bunzendahl H, Brenner DA, Jude SR, Zhong Z and Thurman RG.** Gene delivery of Cu/Zn-superoxide dismutase improves graft function after transplantation of fatty livers in the rat. *Hepatology* 32: 1255-1264, 2000.
169. **Smith TA, Mehaffey MG, Kayda DB, Saunders JM, Yei S, Trapnell BC, McClelland A and Kaleko M.** Adenovirus mediated expression of therapeutic plasma levels of human factor IX in mice. *Nat Genet* 5: 397-402, 1993.
170. **Engelhardt JF, Ye X, Doranz B and Wilson JM.** Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6196-6200, 1994.
171. **Morral N, O'Neal W, Zhou H, Langston C and Beaudet A.** Immune responses to reporter proteins and high viral dose limit duration of expression with adenoviral vectors: comparison of E2a wild type and E2a deleted vectors. *Hum Gene Ther* 8: 1275-1286, 1997.
172. **Farhood A, McGuire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW and Jaeschke H.** Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Leukoc Biol* 57: 368-374, 1995.
173. **Lentsch AB, Yoshidome H, Cheadle WG, Miller FN and Edwards MJ.** Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: roles for macrophage inflammatory protein-2 and KC. *Hepatology* 27: 1172-1177, 1998.
174. **Neyzen S, Van de LE, Borkham-Kamphorst E, Herrmann J, Hollweg G, Gressner AM and Weiskirchen R.** Cryopreservation of hepatic stellate cells. *J Hepatol* 44: 910-917, 2006.
175. **Swales NJ, Luong C and Caldwell J.** Cryopreservation of rat and mouse hepatocytes. I. Comparative viability studies. *Drug Metab Dispos* 24: 1218-1223, 1996.
176. **de Sousa G, Langouet S, Nicolas F, Lorenzon G, Placidi M, Rahmani R and Guillouzo A.** Increase of cytochrome P-450 1A and glutathione transferase transcripts in cultured hepatocytes from dogs, monkeys, and humans after cryopreservation. *Cell Biol Toxicol* 12: 351-358, 1996.

177. **Chesne C and Guillouzo A.** Cryopreservation of isolated rat hepatocytes: a critical evaluation of freezing and thawing conditions. *Cryobiology* 25: 323-330, 1988.
178. **Chesne C, Guyomard C, Fautrel A, Poullain MG, Fremond B, De Jong H and Guillouzo A.** Viability and function in primary culture of adult hepatocytes from various animal species and human beings after cryopreservation. *Hepatology* 18: 406-414, 1993.
179. **Jackson BA, Davies JE and Chipman JK.** Cytochrome P-450 activity in hepatocytes following cryopreservation and monolayer culture. *Biochem Pharmacol* 34: 3389-3391, 1985.
180. **Utesch D, Diener B, Molitor E, Oesch F and Platt KL.** Characterization of cryopreserved rat liver parenchymal cells by metabolism of diagnostic substrates and activities of related enzymes. *Biochem Pharmacol* 44: 309-315, 1992.
181. **Salmon F and Kohl W.** Use of fresh and cryopreserved hepatocytes to study the metabolism of pesticides in food-producing animals and rats. *Xenobiotica* 26: 803-811, 1996.
182. **Hay RJ.** *TCA Manual* 4: 787-790, Procedure 18601. 1978.
183. **Lakota J and Fuchsberger P.** Autologous stem cell transplantation with stem cells preserved in the presence of 4.5 and 2.2% DMSO. *Bone Marrow Transplant* 18: 262-263, 1996.
184. **Lovelock JE and BISHOP MW.** Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183: 1394-1395, 1959.
185. **McGann LE.** Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. *Cryobiology* 15: 382-390, 1978.
186. **Meryman HT.** Cryoprotective agents. *Cryobiology* 8: 173-183, 1971.
187. **Farrant J.** *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*. Kent: Pitman Medical Limited, 1980.
188. **Mazur P, Leibo SP and Chu EH.** A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res* 71: 345-355, 1972.
189. **Mazur P.** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247: C125-C142, 1984.

190. **Zaleski J, Richburg J and Kauffman FC.** Preservation of the rate and profile of xenobiotic metabolism in rat hepatocytes stored in liquid nitrogen. *Biochem Pharmacol* 46: 111-116, 1993.
191. **Madan A, DeHaan R, Mudra D, Carroll K, LeCluyse E and Parkinson A.** Effect of cryopreservation on cytochrome P-450 enzyme induction in cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 27: 327-335, 1999.
192. **Li AP, Gorycki PD, Hengstler JG, Kedderis GL, Koebe HG, Rahmani R, de Sousas G, Silva JM and Skett P.** Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel. *Chem Biol Interact* 121: 117-123, 1999.
193. **Uesugi T, Froh M, Artee GE, Bradford BU, Wheeler MD, Gabele E, Isayama F and Thurman RG.** Role of lipopolysaccharide-binding protein in early alcohol-induced liver injury in mice. *J Immunol* 168: 2963-2969, 2002.
194. **Yin M, Bradford BU, Wheeler MD, Uesugi T, Froh M, Goyert SM and Thurman RG.** Reduced early alcohol-induced liver injury in CD14-deficient mice. *J Immunol* 166: 4737-4742, 2001.

10 Anhang

10.1 Danksagungen

Für seine großzügige Unterstützung danke ich Herrn **Prof. Dr. Jürgen Schölmerich** sehr herzlich; er ermöglichte die Arbeit. Ich habe mich als Apotheker im Kreis der Ärzte der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I immer wohl und gut aufgenommen gefühlt.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei meinen Betreuern, Herrn **PD. Dr. Claus Hellerbrand** und Herrn **Dr. Matthias Froh**. Sie haben meine wissenschaftliche Arbeit so begleitet, wie sich dies ein Doktorand nur wünschen kann und waren stets offen für all meine Fragen und Bitten; ihre Geduld war grenzenlos. Sie haben mich außerordentlich unterstützt und mir darüber hinaus auch einen wertvollen Gedankenaustausch auf internationalen Kongressen ermöglicht.

Herrn **Prof. Dr. Sigurd Elz** möchte ich für die Bereitschaft danken, die fakultätsinterne Vertretung dieser Dissertation zu übernehmen, wodurch diese Promotion erst ermöglicht wurde. Ich danke ihm auch für sein Engagement während meines Studiums und für die positive Unterstützung meiner Arbeit.

Vielen Dank möchte ich auch den Forschungsleitern Herrn **Prof. Dr. Werner Falk**, Herrn **Prof. Dr. Rainer Straub** und Herrn **PD. Dr. Caspar Franzen** für die konstruktiven Vorschläge und neuen Ideen aussprechen.

Mein spezieller Dank geht auch an Herrn **PD. Dr. Thomas Langmann**, Herrn **Dr. Martin Hausmann** und Herrn **Dr. Christoph Möhle** für die Kooperation bei den Microarray Experimenten und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Meinen Laborkollegen **Birgitta, Christine, Christoph, Conny, Dita, Elena, Erwin, Gabi, Hella, Kang-Hong, Marina, Markus, Yvonne, Susanne und Thomas** danke ich für die angenehme Atmosphäre und die stets gute Zusammenarbeit. Deshalb vielen Dank für 3 Jahre „schönen Alltag“. Insbesondere möchte ich mich bei **Thomas**

Amann für die Gespräche und bei meiner Arbeitskollegin **Susanne Netter** für die erhaltene Unterstützung und die stets aufbauenden Worte bedanken.

Liebe Sportsfreunde **Christian, Christoph, Claudia, Eddy, Gerhard, Maja, Moni, Olli, Richard, Sabine, Silke, Susanne, Sven, Thomas,...** : Danke für die vielen Klinikumsrunden, Radel-Sessions,... und die kalorienarmen Burger hinterher ☺ - und ich sag jetzt einfach mal Kopf hoch unseren Rekonvaleszenten !!!

Herzliches Dankeschön auch an alle **H1-ler** für das nette Arbeitsklima und die gemeinsamen Unternehmungen und Freizeitgestaltungen – sportlicher, kultureller und kulinarischer Art.

Weiterhin möchte ich mich ausdrücklich bei allen hier nicht namentlich aufgeführten Personen bedanken, die in irgendeiner Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen **Eltern** und meiner **Familie** danke ich, dass sie mich durch Kindergarten, Schule und Studium begleitet haben. Vielen Dank für jegliche Art der Unterstützung!

10.2 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Posterpräsentationen:

GASL (01/2005, Ulm):

- Effects of Heme Oxygenase-1 overexpression on liver Injury after bile duct ligation (M. Froh, E. Gäbele, P. Walbrun, C. Hellerbrand, S. Netter, J. Schölmerich, L. Conzelmann)
- Repopulation of Kupffer Cells in rat livers: Effects of different pre-treatments of the recipient (P. Walbrun, S. Netter, J. Schölmerich, M. Froh)

DGIM (04/2005, Wiesbaden):

- Kryokonservierung von Kupffer-Zellen (M. Froh, P. Walbrun, S. Netter, J. Schölmerich, C. Hellerbrand)

AASLD (11/2005, San Francisco):

- Heme Oxygenase-1 overexpression increases liver Injury after bile duct ligation (M. Froh, L. Conzelmann, P. Walbrun, C. Hellerbrand, S. Netter, J. Schölmerich, E. Gäbele)

DGIM (04/2006, Wiesbaden):

- Transplantation von Kupffer-Zellen: Einfluss unterschiedlicher Vorbehandlungen des Empfängers auf die Repopulationsrate (P. Walbrun, S. Netter, J. Schölmerich, M. Froh)

AASLD (10/2006, Boston):

- Cryopreservation of human Kupffer Cells allows the *in vitro* comparison of several donors (P. Walbrun, S. Netter, T. Weiss, J. Schölmerich, C. Hellerbrand, M. Froh)

GASL (01/2007, Göttingen):

- Adenoviral gene delivery of interleukin-10 inhibits Kupffer Cells activation *in vitro* (P. Walbrun, S. Netter, R. Wiest, E. Gäbele, J. Schölmerich, C. Hellerbrand, M. Froh)

Vorträge:

GASL (01/2007, Göttingen):

- Adenoviral gene delivery of interleukin-10 reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats (P. Walbrun, S. Netter, R. Wiest, E. Gäbele, J. Schölmerich, C. Hellerbrand, M. Froh)

Veröffentlichungen:

Journal of Cryobiology:

- Characterization of rat and human Kupffer cells after cryopreservation (P. Walbrun, C. Hellerbrand, T. Weiss, S. Netter, E. Gäbele, B. Schnabl, M. Mühlbauer, R. Wiest, D. Neumaier, J. Schölmerich, M. Froh) (in press)

10.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitates gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeldliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 22.12.2006

(Peter Walbrun)