Aus der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Königsrainer

Expressionsveränderung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 auf Leberendothelzellen unter Hypoxie und Reoxigenierung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Birgit Dorothe Benz
aus
Tübingen

2007

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter	Professor Dr. R. Viebahn
2. Berichterstatter	Privatdozentin Dr. D. Siegel-Axel

Meinen Eltern

und

Marcus

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung ---------- 1

1.1. Lebertransplantation – Historie und Indikationen ---------- 1
1.2. Pathomechanismen der Organabstoßung ---------- 2
1.2.1. Phase 1 der Organabstoßung ---------- 2
1.2.2. Phase 2 der Organabstoßung ---------- 7
1.3. Die Adhäsionsmoleküle ---------- 8
1.3.1. Funktion der Adhäsionsmoleküle ---------- 8
1.3.2. Die Zelladhäsionskaskade ---------- 8
1.4. Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 ---------- 16
1.4.1. Die Struktur von ICAM-1 ---------- 16
1.4.2. Expression von ICAM-1 ---------- 16
1.4.3. Liganden und deren Bindung ---------- 17
1.4.4. Funktionen von ICAM-1 ---------- 18
1.5. Ziel der vorliegenden Arbeit ---------- 18

2. Material und Methoden ---------- 20

2.1. Versuchstiere ---------- 20
2.2. Liste der Materialien ---------- 20
2.2.1. Chemikalien ---------- 20
2.2.2. Verbrauchsmaterial ---------- 21
2.2.3. Geräte ---------- 22
2.3. Präparation nicht-parenchymatöser Leberzellen ---------- 22
2.3.1. Vorbereitung der Präparation ---------- 22
2.3.2. Präparation ---------- 23

2.3.3. Zentrifugationsschritte und Elutriation ---- 24
2.4. Durchflusszytometrie-Analyse ---- 26
2.5. Zellkultivierung ---- 26
2.6. Versuchsansatz ---- 27
2.7. Zellfixierung und Antikörperfärbung ---- 27
2.8. Messung der Fluoreszenz des FITC-Konjugates ---- 28
2.9. Propidiumjodidfärbung ---- 28
2.10. Messung der Propidiumjodidfluoreszenz ---- 29
2.11. Statistische Methoden ---- 29

3. Ergebnisse ---- 31

3.1. Präparation ---- 31
3.2. Charakterisierung der nichtparenchymalen Zelltypen ---- 31
3.3. Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen ---- 34

4. Diskussion ---- 38

4.1. Zellmodelle ---- 38
4.2. Ergebnisse ---- 39
4.2.1. Elutriation ---- 39
4.2.2. Untersuchung der Expressionsveränderungen ---- 40
4.2.3. Experimentelle Studien ---- 41
4.2.4. Klinische Studien ---- 45
4.2.5. Schlussfolgerungen ---- 46

5. Zusammenfassung ---------- 48

6. Literaturverzeichnis ---------- 50

7. Abkürzungsverzeichnis ---------- 54

1. Einleitung

1.1. Lebertransplantation – Historie und Indikationen

Die experimentellen Versuche zur Lebertransplantation reichen zurück bis in die fünfziger Jahre des letzten Jahrhunderts. Moore und Starzel arbeiteten zunächst an einem Programm mit Leberallotransplantaten bei Hunden. Moore et al. zeigten 1959 als Erste, dass die Operation durchführbar war und dass die transplantierte Leber ihre Funktion bis zur Abstoßung aufrechterhalten konnte (Moore FD et al., 1959). Starzl et al. gelang es 1965 ein langfristiges Überleben der Organe in Azathioprin behandelten Hunden zu erreichen. Diese Arbeitsgruppe führte die erste humane Lebertransplantation 1963 in Denver durch, gefolgt von Calne 1968 in Cambridge. Die erste humane Lebertransplantation in Deutschland wurde 1969 in Bonn von A. Gütgemann durchgeführt (Gütgemann A et al., 1969).

Heute ist die Lebertransplantation ein etabliertes therapeutisches Verfahren bei einer Vielzahl von akuten und chronischen Erkrankungen, die zur terminalen Leberinsuffizienz führen. Dazu zählen unter anderen Stoffwechselerkrankungen, akutes Leberversagen, cholestatische Lebererkrankungen, Infektionen und in sehr eingeschränktem Umfang Lebertumoren.

Dennoch stellt die Schädigung des Organs während der Transplantation, bedingt durch die chirurgische Prozedur sowie in weit bedeutenderem Ausmaß durch die Konservierung des Organs, ein großes Problem dar. Die klinischen Korrelate dieser Schädigung sind die initiale Funktionslosigkeit des Organs oder die akute bzw. chronische Abstoßungsreaktion mit der dadurch resultierenden Funktionsstörung des Organs. Um die betroffenen Patienten mit einem Organ mit möglichst guter Funktion versorgen zu können, müssen die bisher bekannten zugrundeliegenden Pathomechanismen weiter erforscht und verstanden werden um daraus bessere Methoden des Transplantations-

verfahrens sowie therapeutischen Optionen bei eingetretenen Schäden entwickeln zu können.

1.2. Pathomechanismen der Organabstoßung

Die Organabstoßung nach Transplantation ist im Wesentlichen eine zellvermittelte Immunantwort des Empfängers auf Alloantigene des Spenders. Dieses Geschehen lässt sich in zwei Phasen unterteilen: in der ersten Phase kommt es zur Erkennung des Alloantigens mit folgender Aktivierung und Proliferation der Lymphozyten, vor allem T-Lymphozyten. In der zweiten Phase wandern die Lymphozyten in das Transplantat ein und zerstören dort Zellen des Gewebeverbandes.

1.2.1. Phase 1 der Organabstoßung

Der initiale Schritt im Geschehen einer Organabstoßung besteht darin, dass immunkompetente Zellen (v.a. T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen) des Empfängers das Transplantatgewebe als „fremd“ erkennen.

Der Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex

Die Erkennung eines Gewebes als „fremd“ beruht im Wesentlichen auf Unterschieden in den Haupt-Histokompatibilitäts-Antigenen. Diese werden auf Chromosom 6 im Major histocompatbility complex, MHC-Region respektive beim Menschen HLA-Complex (Humanes Leukozytenantigen) genannt, kodiert. Dabei werden 3 Gruppen von Genprodukten unterschieden: MHC-Klasse I - Moleküle, MHC-Klasse II - Moleküle und Klasse III - Produkte.

Die MHC-Klasse I - Moleküle sind Glykoproteine, die auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden. Sie sind verantwortlich für die Aktivierung von T-Zellen, die das CD8 Oberflächenmolekül tragen (Dallman MJ, 2001), sogenannte zytotoxische T-Zellen (T_C-Zellen).

MHC-Klasse II - Moleküle sind ebenso Glykoproteine, die hauptsächlich auf antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen, Dendritische Zellen und B-Zellen (Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, 2000), sowie auf einigen

Endothelzellen (Dallman MJ, 2001) vorkommen. MHC-Klasse II - Moleküle stimulieren T-Zellen, die das CD4 Oberflächenmolekül tragen, die man auch als T-Helferzellen (T_H-Zellen) bezeichnet.
Es wurde beschrieben dass Langerhanszellen und Endothelzellen, die die Blutgefäße auskleiden, in die Alloantigenpräsentation eingebunden sind. Beide Zelltypen exprimieren MHC-Klasse I - und II - Moleküle/Antigene (Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, 2000).

Bei der Synthese und dem Transport von MHC-Klasse I - und II - Proteinen zur Zelloberfläche wird ihnen ein Peptid hinzugefügt. Dieses Peptid kann entweder von intrazellulär synthetisierten oder bereits vorhandenen Proteinen stammen oder von extrazellulären Antigenen, die durch Endozytose in die Zelle aufgenommen wurden und über endosomale/ lysosomale Wege abgebaut wurden (Monaco JJ, 1995). Dieses Peptid dient in Verbindung mit seinem MHC-Molekül gegenüber Lymphozyten der Erkennung zwischen selbst und fremd.
Die Klasse III - Produkte umfassen Proteine, die immunologische Funktionen haben. Dazu gehören Komponenten des Komplementsystems, sowie die Zytokine TNF-α und TNF-β.

Antigenerkennung und Aktivierung der Lymphozyten

Eine T-Zelle (CD4+ oder CD8+) kann ein Antigen nur mit Hilfe ihres antigenspezifischen T-Zell - Rezeptor (TCR), der an das entsprechende MHC-Molekül (II/I)+ Peptid bindet, erkennen. Die Antigenerkennung ist über verschiedene Wege möglich:

Die T-Helferzelle (CD4+ - Zelle) des Empfängers erkennt ihr Antigen bei der Interaktion mit einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) des Spenders und wird aktiviert. In Abhängigkeit des Gewebes kommen verschiedene Zellen als APC in Frage. Im Wesentlichen sind dies die Dendritischen Zellen, da sie in den

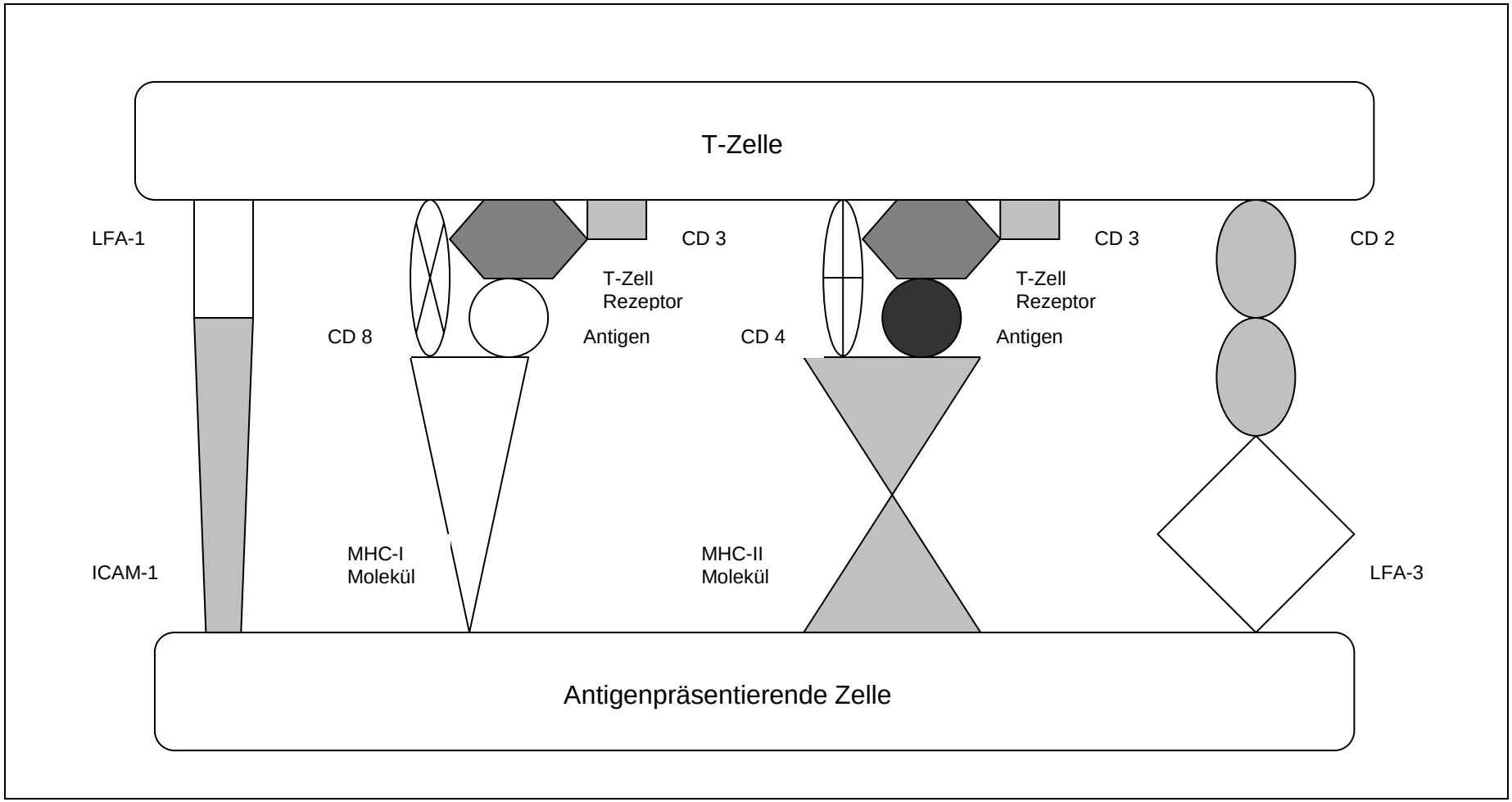


Abbildung 1: Involvierte Moleküle (Auswahl) bei der Interaktion von T-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen, in Anlehnung an Heemann UW et al., 1994.

meisten Geweben gefunden werden. Sie sind durch eine hohe MHC-Klasse II - Expression gekennzeichnet (Abbildung 1).

Die Alloantigenpräsentation wird auch von Gefäßendothel übernommen, das sowohl MHC-Klasse I - und II - Antigene exprimiert (Goldsby, RA, Kindt TJ, Osborne BA, 2000).

Vereinzelt können Dendritische Zellen auch als sogenannte „wandernde Leukozyten“ (passenger leukocytes) mit einer hohen MHC-Klasse II – und normaler MHC-Klasse I - Expression in die regionalen Lymphknoten des Empfängers einwandern und dort die Aktivierung von CD8+ und CD4+ Lymphozyten hervorrufen.

Eine weitere Möglichkeit der Antigenerkennung besteht darin, dass APC des Empfängers in das Transplantat einwandern, dort Antigene durch Endozytose aufnehmen und Fragmente davon an ihrer Oberfläche präsentieren.

Die Erkennung der Alloantigene zieht, unter der Vorraussetzung eines kostimulatorischen Signals, eine starke T-Zellproliferation im Empfänger nach sich, wobei die Aktivierung der T-Helferzellen (CD4+ Zellen) im Vordergrund steht. Fehlt dieses kostimulatorische Signal kann die T-Zelle anerg oder areagibel werden (Schwartz RH,1990).

Es existieren zahlreiche Oberflächenproteine auf den T-Zellen, die möglicherweise dazu beitragen, dass dieses kostimulatorische Signal entsteht, zum Teil auch in Wechselwirkung mit Oberflächenmolekülen der APC. Die T-Zellen erhalten weitere wichtige Signale durch die Bindung von Zytokinen an deren spezifische Rezeptoren auf der T-Zelle.

Bei der Aktivierung der T-Helferzellen entwickeln sich diese zu Effektorzellen, die unterschiedliche Zytokine (IL-2, TNF-β, IFN-γ, IL-4, IL-5) sezernieren. Eine zentrale Rolle spielt das Interleukin 2 (IL-2) bei der Aktivierung von

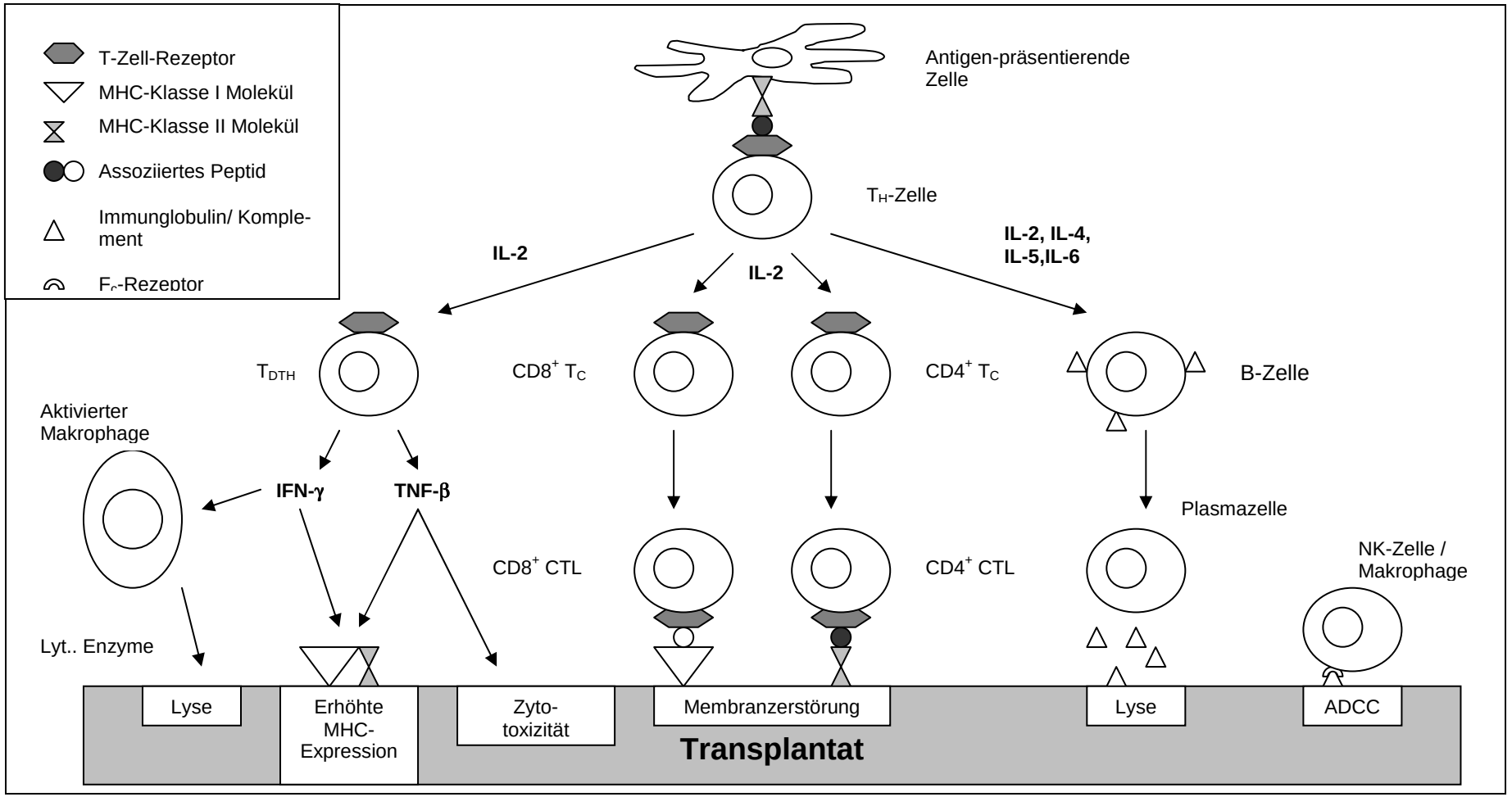


Abbildung 2: Effektormechanismen in Anlehnung an Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby Immunology, 4. Ausgabe, 2000. ADCC: Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität, T_c-Zellen: T zytotoxische Zellen, CTL: Zytotoxische T-Lymphozyten, T_{DTH} :T-Zellen involviert in Bildung des Spättyps der Überempfindlichkeitsreaktion, T_H-Zelle: T-Helferzelle.

zytotoxischen Zellen (T_c-Zellen) zu zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). Ebenso für die Aktivierung von T_{DTH}-Zellen und B-Lymphozyten.
Das Zytokin TNF-β (ebenso wie IFN-α, -β und -γ, TNF-α) erhöht die MHC-Klasse I - Molekülexpression. IFN-γ erhöht die MHC-Klasse II – Molekül-expression.

1.2.2. Phase 2 der Organabstoßung

In der zweiten Phase der Organabstoßung kommt es zur Zerstörung von Zellen durch unterschiedliche Mechanismen. Dabei stellt die direkt zellvermittelte Zerstörung den Hauptanteil dar. Eine der wichtigsten Merkmale dabei ist die Einwanderung aktivierter Zellen in das Transplantat. Die über das Blutgefäß ankommenden Zellen benötigen Oberflächenmoleküle, die ihnen die Bindung an das Gefäß mit der anschließenden Durchwanderung des Endothels bis in das Transplantatgewebe ermöglicht. Diese essentielle Funktion übernehmen die Adhäsionsmoleküle.

Nach Durchwanderung des Endothels entfalten die CD8+ Lymphozyten bei der Erkennung ihres spezifischen Antigens auf MHC-Klasse I - Molekül tragenden Zellen ihre zytotoxische Wirkung. Daneben gibt es in einigen Fällen auch CD4+ T-Zellen, die nach Kontakt mit MHC-Klasse II - tragenden Zellen, zytotoxisch wirken (Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA). Auch einzelne Zytokine wie TNF-β können direkt zytotoxisch wirken. Eingewanderte und aktivierte Makrophagen (durch IFN-γ bedingt) ähneln dem histologischen Bild einer Spät-Typ Hypersensibilisierungsantwort und können im Transplantat eine Zerstörung durch lytische Enzyme hervorrufen. Des weiteren sind auch B-Lymphozyten nach direkter Antigenerkennung durch Bildung von Antikörpern an der Zerstörung beteiligt, allerdings in viel geringerem Ausmaß als die direkt zellvermittelten Vorgänge (Abbildung 2).

1.3. Die Adhäsionsmoleküle

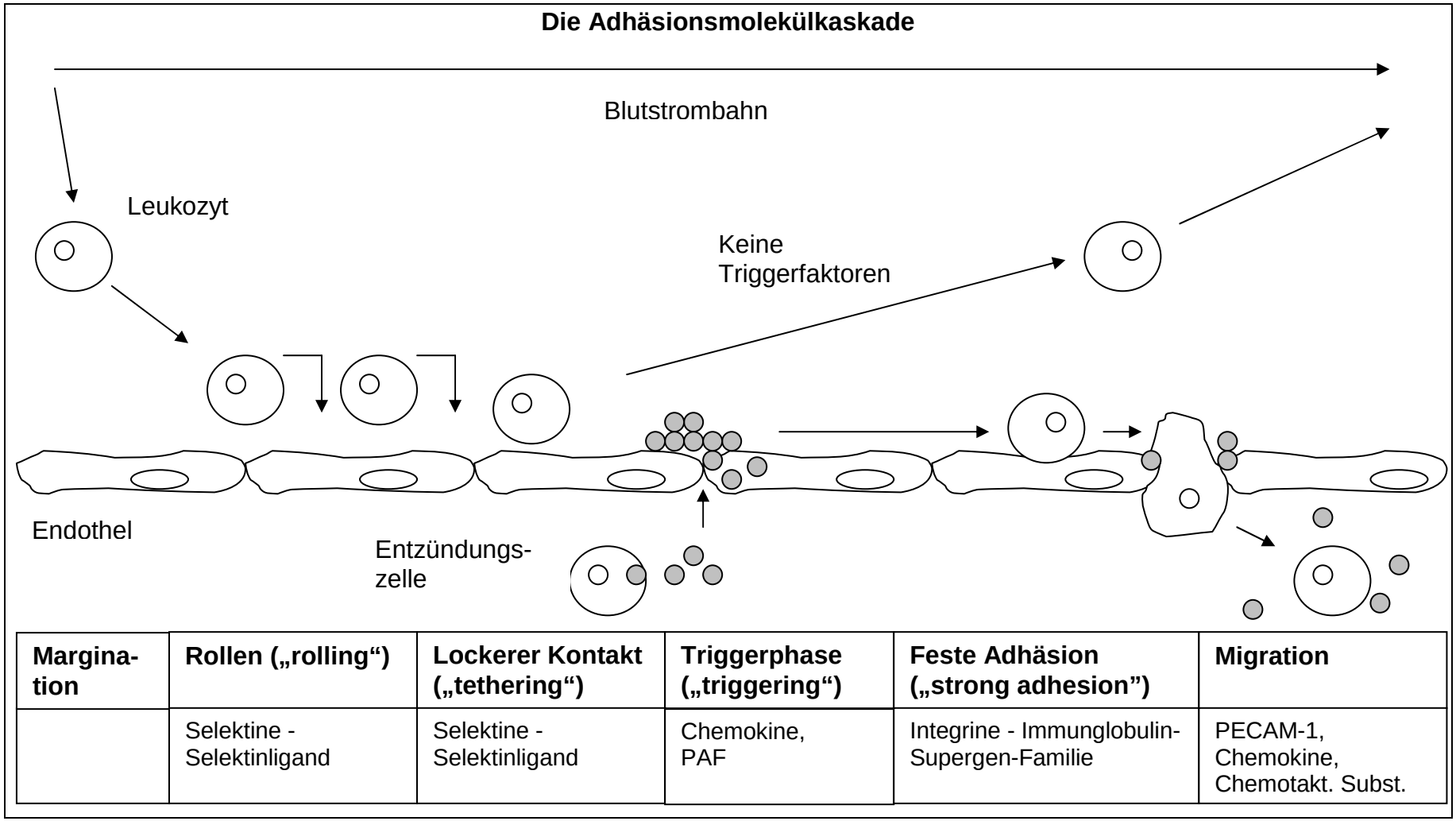
1.3.1. Funktion der Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle sind Zellmembranglykoproteine, die eine zentrale Rolle in der Vermittlung von Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen spielen (Shah V et al., 1997). Diese Adhäsionsprozesse spielen in vielen, ganz unterschiedlichen biologischen Prozessen wie zum Beispiel der Embryonalentwicklung, der Hämatopoese und der Immunologie (Einwanderung und Aktivierung von Leukozyten) eine Rolle (van de Stolpe A, van der Saag PT, 1996). Zelladhäsion scheint ein allgemeines biologisches Prinzip darzustellen, dass in seinen Grundschritten gewebeunabhängig und auch unabhängig von dem auslösenden Grund (physiologische/ pathophysiologische Ereignisse: Entzündung, Abstoßung,...) zu sein scheint (Schürmann G, 1997). Die Ausbildung biologischer Prozesse hängt somit von der Wanderung mobiler Zellen ab, wobei die Interaktion zwischen zirkulierenden Leukozyten und Gefäßendothelzellen eine wichtige Rolle einnimmt. Diese Interaktion läuft in Form einer komplexen Zelladhäsionskaskade ab, die unterschiedliche Untergruppen der Adhäsionsmoleküle (Selektine, Integrine, Immunglobulin-superfamilie) einbezieht.

1.3.2. Die Zelladhäsionskaskade

Die Zelladhäsionskaskade umfasst die Schritte Margination, Rollen („rolling“), lockerer Kontakt („tethering“), Triggerphase („triggering“), feste Adhäsion („strong adhesion“) und Migration (Abbildung 3).

Der einleitende Schritt dieser Kaskade besteht aus der **„Margination“**, hierbei verlassen zirkulierende Leukozyten ihre zentrale Position in der Blutstrombahn in Richtung Gefäßendothel, an dem sie anschließend unter deutlicher Reduktion ihrer Flussgeschwindigkeit entlangrollen („rolling“). Das **„Rollen“** entlang des Gefäßendothels sowie der **lockere Kontakt** zu diesem („tethering“) wird durch die **Selektine** vermittelt (Schürmann G,1997). Die Familie der



Margina-tion	Rollen („rolling“)	Lockerer Kontakt („tethering“)	Triggerphase („triggering“)	Feste Adhäsion („strong adhesion”)	Migration
	Selektine - Selektinligand	Selektine - Selektinligand	Chemokine, PAF	Integrine - Immunglobulin-Supergen-Familie	PECAM-1, Chemokine, Chemotakt. Subst.

Abbildung 3: Die Adhäsionsmolekülkaskade zusammengefasst von Adams DH et al.(1994), Schürmann G (1997), Carlos TM et al. (1994).

Selektine umfasst drei lektinähnliche, carbohydratbindende Moleküle: L-Selektin, E-Selektin und P-Selektin (Tabelle 1). Die Namen der einzelnen Selektine leiten sich von der Zelle ab, auf der sie zuerst entdeckt wurden; L-Selektin - Lymphozyten, E-Selektin - Endothelzellen und P-Selektin - Thrombozyten (platelet) (Adams DH, Shaw S, 1994; Schürmann G, 1997).
L-Selektin (CD 62L) wird von den meisten Leukozyten konstitutionell exprimiert. Im Gegensatz dazu wird E-Selektin (CD 62E) erst nach Aktivierung der Endothelzellen durch Zytokine synthetisiert und exprimiert (Adams DH, Shaw S, 1994; Schürmann G, 1997). P-Selektin (CD 62P) wird in Thrombozyten und Endothelzellen synthetisiert und in zytoplasmatischen Granulas gespeichert. Durch Aktivierung dieser Zellen wird P-Selektin an die Zellmembran befördert (Carlos TM, Harlan JM,1994).

Tabelle 1: Systematik der Selektine in Anlehnung an Schürmann G, 1997; Janeway CA et al., 1995.

Molekül	**CD-Nomenklatur**	**Vorkommen**	**Ligand (CD-Nomenklatur)**	**Vorkommen**
L-Selektin	CD 62L	B-, T-Zellen, NK, Monozyten	CD 34 GlyCAM-1 MAdCAM-1	Endothelzellen
E-Selektin	CD 62E	Endothelzellen	CD 15 (s) CD 11/CD 18 CD 62L CD 66	Neutrophile, Monozyten Leukozyten B-,T-Zellen, NK, Monozyten Leukozyten
P-Selektin	CD 62P	Thrombozyten, Endothel,	CD 15 (s) CD 62L	Neutrophile, Monozyten B-, T-Zellen, NK, Monozyten

Die Selektine sind für die Herstellung des lockeren Kontaktes gut geeignet, da ihre langen Molekularstrukturen über die umgebende Glykokalix hinausreichen. Dies erlaubt ihnen vorbeifließende Leukozyten, die den passenden Rezeptor exprimieren, „einzufangen“ (Lasky LA, 1992). Jedes Selektin erkennt spezifische Carbohydrat-Sequenzen entweder auf Leukozyten (E-Selektin, P-Selektin) oder auf Endothelzellen (L-Selektin) und vermittelt hierdurch den lockeren, reversiblen Kontakt dieser Zellen. Nur durch lokal vorhandene oder lokal bereitgestellte Triggerfaktoren (Integrin-aktivierenden Substanzen) kann die Aktivierung oder Induktion von Leukozytenintegrinen erfolgen (Adams DH, Shaw S, 1994; Schürmann G, 1997). Dieser Schritt, die **Triggerphase** („triggering“), ist wichtig, dass die feste Adhäsion entstehen kann. Fehlen diese Faktoren dann können Leukozyten den lockeren Kontakt lösen und weiter im Blut zirkulieren.

Zur Herstellung eines festen Kontaktes zwischen Endothelzellen und Leukozyten müssen Integrine auf den Leukozyten aktiviert werden, da sie sonst schlechte Bindungseigenschaften aufweisen. Die Aktivierung wird über Triggerfaktoren ausgelöst. Ein Beispiel für solche Triggerfaktoren ist das Zytokin IL-8, das entweder vom Endothel oder von darunter liegenden Entzündungszellen gebildet wird. An das Endothel gebundenes IL-8 kann nun die Aktivierung von Neutrophilen auslösen (Adams DH, Shaw S,1994). Des weiteren wirkt an das Endothel gebundenes PAF (platelet activating factor) als Triggerfaktor für Neutrophile. PAF wird von Endothelzellen nach Stimulation mit Histamin, Thrombin oder Leukotrienen produziert. Das Chemokin MIP-1β (macrophage inflammatory protein 1β) kann als immobilisiertes Molekül T-Zellintegrine aktivieren (Adams DH, Shaw S,1994).

Die **feste Adhäsion** („stong adhesion“) wird durch Leukozytenintegrine, die an den entsprechenden Rezeptor auf dem Endothel (Mitglieder der Immun-globulinsuperfamilie) binden, vermittelt.
Integrine sind transmembranöse, heterodimere Membranglykoproteine, die aus zwei nichtkonvalent gebundenen Polypeptidketten, α und β, bestehen (Carlos

TM et al., 1994, Adams DH et al.,1994, Heemann UW et al.,1994). Jede einzelne Kette besteht aus einem extrazellulären, transmembranösen und zytoplasmatischen Segment (Heemann UW et al.,1994, Albelda SM et al., 1990). Integrine lassen sich anhand ihrer β-Kette in verschiedene Untergruppen einteilen. Bisher wurden 8 verschiedene β-Ketten identifiziert, wovon die β1- und β2-Ketten die wichtigsten im Bezug auf Zellwanderung und Adhäsionsprozesse darstellen (Heemann UW, 1994).

In der β1-Untergruppe (CD 29) vermittelt das Integrin VLA-4 (very late antigen-4, CD 29/CD 49d) den festen Kontakt von Leukozyten (Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen, Eosinophile und Basophile) an zytokin-aktivierte Endothelzellen (Adams DH et al.,1994, Carlos TM et al.,1994).

Aus der β2-Untergruppe (CD 18) sind die Proteine LFA-1 (CD 18/ CD 11a), sowie Mac-1 (CD18/CD 11b) und p150,95 (CD 18/CD 11c) in Bindung an den entsprechenden Liganden für die Herstellung eines festen Kontaktes verantwortlich (Adams DH et al., 1994). LFA-1 wird auf den meisten Gruppen von weißen Blutzellen exprimiert. Es ist in die T-Zell-, NK-Zell- und Antikörper bedingte Zytotoxizität sowie in T-Helferzellfunktionen, wie zum Beispiel B- und T-Zellproliferation, involviert (Albelda SM et al.,1990, Schürmann G.,1997). Mac-1 wird auf Neutrophilen, Monozyten und einigen Lymphozyten exprimiert (Albelda SM et al.,1990). Alle drei β2-Integrine werden auf Neutrophilen, Monozyten und NK-Zellen gefunden (Carlos TM et al., 1994), (Tabelle 2).

Die **Immunglobulinsuperfamilie** umfasst verschiedenste Moleküle mit dem Kennzeichen einer oder mehrer Ig-Domänen (Tabelle 3). Es existieren wiederum Untergruppen, wobei die C2-Gruppe Moleküle zusammenfasst, die auch an der Leukozytenadhäsion beteiligt sind. Dazu zählen unter anderen ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1, CD 54), ICAM-2 (CD 102), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1, CD 106) und PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, CD 31) (Carlos TM et al., 1994). Weitere wichtige

Tabelle 2: Übersicht über Integrine (Auswahl) zusammengefasst aus Schürmann G, 1997; Adams DH et al., 1994; Janeway CA et al.,1995.

Molekül	**CD-Nomenklatur**	**Vorkommen**	**Ligand (CD-Nomenklatur)**	**Vorkommen**
β1-Familie: VLA-4	CD 49d/CD 29	Lymphozyten, Monozyten	VCAM-1 (CD 106)	Endothelzellen
			Fibronektin	Bindegewebszellen Extrazell. Matrix
β2-Familie: LFA-1	CD 11a/CD 18	Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen	ICAM-1 (CD 54)	Endothelzellen
			ICAM-2 (CD 102)	Endothelzellen, ruhende Lymphozyten, Monozyten
Mac-1	CD 11b/CD 18	NK, Neutrophile, Monozyten	ICAM-1 (CD 54)	Endothelzellen
p 150,95	CD 11c/CD 18	Myeloide Zellen	Fibrinogen	Blut

Vertreter der Immunglobulinsuperfamilie sind der TCR, CD3, MHC-Klasse I und II, CD4 ,CD8, LFA-3. Diese Moleküle sind in die T-Zellproliferation involviert ebenso wie in intrazelluläre Vorgänge, die die Antigenbindung an den TCR/CD3-Komplex unterstützen (Heemann UW et al.,1994); (siehe Abbildung).

Der passende Ligand für ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3 ist LFA-1. Die Interaktion zwischen ICAM-1 und LFA-1 führt einerseits zu einer festen Bindung eines Leukozyten an das Endothel (Vorraussetzung für die Migration); führt andererseits aber auch zur Signaltransduktion in Zellen mit anschließendem Zellwachstum und Zelldifferenzierung.

Durch die Bindung von VCAM-1 an seinen Liganden VLA-4 wird die feste Adhäsion von Lymphozyten und Monozyten an das Endothel vermittelt (Adams DH et al.,1994).

Die **Migration** stellt nun den letzten Schritt in dieser Kaskade dar; sie umfasst die transendotheliale Passage und die weitere Zellwanderung im Gewebe. Diese erfolgt nach der festen Adhäsion der Leukozyten an das Endothel unter dem Einfluss von **promigratorischen Faktoren**. Zu diesen Faktoren zählt IL-8, das auf Neutrophile wirkt. MIP-1β induziert die Migration von T-Zell-Untergruppen (Adams DH et al.,1994). „In vitro“ Studien zeigen, dass leukozytäres und endotheliales PECAM-1 direkt an dem Prozess der Diapedese von Neutrophilen und Monozyten zwischen Endothelzellen beteiligt sind (Muller WA et al.,1993).

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Verteilung und Wirkung der an der Adhäsionskaskade beteiligten Elemente entsteht ein sehr spezifischer Vorgang. Die Expression und der Aktivierungszustand einzelner Moleküle sowie das Vorhandensein von Triggersubstanzen kann in verschiedenen patho-physiologischen Zuständen (Entzündung, Transplantatabstoßung) deutlich verändert sein (siehe folgende Ausführungen).

Tabelle 3: Übersicht (Auswahl) Immunglobulinsuperfamilie zusammengefasst aus Schürmann G, 1997; Adams DH et al., 1994; Janeway CA et al.,1995; Dallman MJ, 2001; Goldsby RA et al., 2000.

Molekül	**CD-Nomenklatur**	**Vorkommen**	**Ligand (CD-Nomenklatur)**	**Vorkommen**
CD 2	CD 2	T-Zellen, NK,Thymozyten	LFA-3 (CD 58)	Endothelzellen
CD 4	CD 4	T-Helferzellen Inflamm. T-Zellen Monozyten Makrophagen z.T. Thymozyten	MHC-Klasse II	Makrophagen Dendrit. Zellen B-Zellen Endothelzellen Langerhanszellen
CD 8	CD 8	Zytotoxische T-Zellen z.T. Thymozyten	MHC-Klasse I	Fast alle kernhaltigen Zellen Endothelzellen Langerhanszellen
ICAM-1	CD 54	Endothelzellen Makrophagen Dendrit. Zellen B-Lymphozyten Plasmazellen T-Lymphozyten	LFA-1 (CD11a/CD18) Mac-1 (CD11b/CD18)	Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen NK, Neutrophile, Monozyten
ICAM-2	CD 102	Endothelzellen Monozyten Ruhende Lymphozyten	LFA-1 (CD11a/CD18)	Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen
VCAM-1	CD 106	Endothelzellen	VLA-4 (CD 29/CD 49d)	Lymphozyten, Monozyten

1.4. Das Adhäsionsmolekül ICAM-1

1.4.1. Die Struktur von ICAM-1

Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 (CD 54) ist ein transmembranöses Glykoprotein, das der Immunglobulinsuperfamilie angehört. Dieses Protein besteht aus 505 Aminosäuren, davon finden sich 453, vorwiegend hydrophobe Aminosäuren in den 5 Ig-ähnlichen extrazellulären Domänen. 24 Aminosäuren bilden den hydrophoben transmembranösen Anteil, die verbleibenden 28 Aminosäuren befinden sich im zytoplasmatischen Anteil (Staunton DE et al.,1988). Abhängig vom exprimierenden Zelltyp ist ICAM-1 unterschiedlich glykosiliert , so dass das Molekulargewicht zwischen 80 und 114 kDa variiert (van de Stolpe A et al., 1996).

1.4.2. Expression von ICAM-1

Immunhistochemische Studien haben aufgezeigt, dass ICAM-1 auf Endothelzellen, epithelialen Zellen, Makrophagen, Dendritischen Zellen und Fibroblastenähnlichen Zellen in verschiedenen menschlichen Geweben (Thymus, Lymphknoten, Intestinum, Haut, Niere und Leber) exprimiert wird (Dustin ML et al.,1986). Auf hämatopoetischen Zellen findet sich ICAM-1 Expression auf Knochenmarksvorläufern. Zellen der lymphoiden und myeloiden Zellreihe exprimieren ICAM-1 bis zu gewissen Stadien; wohingegen die ICAM-1 Expression auf der Monozytenzellreihe bestehen bleibt (van de Stolpe A et al.; 1996).

Innerhalb des Immunsystems wird ICAM-1 von Zellen der Monozyten-Makrophagen-Zellreihe exprimiert, sowie von B-Lymphozyten, Plasmazellen, T-Gedächtniszellen und aktivierten T-Lymphozyten. Antigenpräsentierende Zellen (z.B. Makrophagen und eine Untergruppe von B-Lymphozyten) exprimieren ICAM-1 in Verbindung mit MHC-Klasse II - Antigen-Komplex (van de Stolpe A et al.,1996).

Jaeschke (1997) berichtet von einer geringen konstitutiven Expression von ICAM-1 auf dem gesamten hepatischen Endothel (umfasst sinusoidale sowie portale und Zentralvenenendothelzellen) und auf Kupfferzellen in normaler Leber. Im Gegensatz dazu berichtet Dustin ML et al. (1986), dass nicht alle

Endothel- und Epithelzelltypen ICAM-1 „in vivo“ exprimieren, so zum Beispiel Portalvenen und Arterien in der Leber.

1.4.3. Liganden und deren Bindung

Die wichtigsten Liganden für ICAM-1 stellen die beiden Mitglieder der Integrinfamilie (β2-Untergruppe) LFA-1 (CD 11a/CD 18) und Mac-1 (CD 11b/CD 18) dar. CD 43 (Sialophorin), dass in großer Menge von Leukozyten und Thrombozyten exprimiert wird, wurde als Rezeptor für ICAM-1 beschrieben, allerdings ist noch unklar in welchem Umfang dieses Molekül zur ICAM-1 vermittelten Adhäsion beträgt (van de Stolpe A et al., 1996). Auch lösliches Fibrinogen und Hyaluron können an ICAM-1 binden.

Die Bindungsstelle für das Integrin LFA-1 befindet sich am Ende der ersten Ig-ähnlichen Region von ICAM-1 (Staunton DE et al., 1990). Möglicherweise hängt die Zugänglichkeit zu diesem Epitop von einem weiteren, glykolisiertem Epitop auf den Ig-ähnlichen Regionen 4 und 5 ab (van de Stolpe A et al.,1996). Die dritte Ig-ähnliche Region von ICAM-1 vermittelt die Bindung zu Mac-1 (Diamond MS et al., 1991).

LFA-1 und Mac-1 müssen aktiviert werden um eine hohe Affinität für die ICAM-1 Bindungsstelle aufzuweisen . Das Binden von LFA-1 und Mac-1 an ICAM-1 ist abhängig vom Vorhandensein von divalenten Kationen. Die Umwandlung von LFA-1 in ein Stadium der hohen Bindungsstärke (Affinität) für ICAM-1 wird induziert durch die Bindung an ICAM-1, die Querverbindung des T-Zell-Rezeptors, Aktivierung der Proteinkinase C oder erhöhter intrazellulärer Kalziumkonzentration (van de Stolpe A et al., 1996). Der Wandel der Affinität wird möglicherweise durch Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne der β-Kette vermittelt, was zu einem Konformationswandel im extrazellulären Teil des LFA-1 Moleküls führt (Hibbs ML et al.,1991).

Die Bedeutung einzelner Veränderungen an der Struktur des ICAM-1 Moleküls für die Affinitätsänderung von ICAM-1 im Bezug auf seine Liganden ist noch

wenig erforscht. Es wurde allerdings berichtet, dass N-gebundene Glykosilierung die Affinität von ICAM-1 für Mac-1 reduziert, vermutlich bedingt durch die „Abschirmung“ der Ligandenbindungsstelle (Diamond MS et al.,1991). Im Gegensatz dazu scheint die Glykosilierung von ICAM-1 keinen Einfluss auf das Binden von LFA-1 zu haben.

1.4.4. Funktionen von ICAM-1

ICAM-1 ist ein Adhäsionsmolekül der Immunglobulinsuperfamilie und vermittelt im Rahmen der Zelladhäsionskaskade durch Bindung an seine Liganden eine spezifische Zell-Zell-Adhäsion. Diese feste Adhäsion stellt die Vorraussetzung für verschiedene Untergruppen von Leukozyten (siehe Expression von ICAM-1) für die Migration und anschließende Wanderung im Gewebe dar. Dieser Schritt ist essentiell für viele physiologische und pathophysiologische Vorgänge in unserem Körper.

Als weitere Funktion von ICAM-1 (durch Interaktion mit LFA-1) wird die Vermittlung der Signaltransduktion in Zellen beschrieben, die dann letztendlich zu Zellwachstum und Zelldifferenzierung führt (Heemann UW et al., 1994).

Bei der zellvermittelten Zytotoxizität spielt ICAM-1 eine kostimulatorische Rolle für die Aktivierung von nicht MHC-abhängigen Killerzellen und für die MHC-Klasse I abhängigen CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten (van de Stolpe A et al., 1996).

1.5. Ziel der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die Rolle des Endothels bei der Expressionsveränderung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 während des Transplantationsverfahrens gerichtet.

Ziel war es zu klären, ob eine Expressionsveränderung von ICAM-1 auf Leberendothelzellen allein durch den Einfluss von Hypoxie und Reoxigenierung

als Modell für Ischämie und Reperfusion stattfindet und wenn ja, diese zu quantifizieren.

Um diese Frage anhand von Zellkulturen zu klären war es notwendig ein System zur Präparation und Zelltrennung anzuwenden, ein System zur Charakterisierung von nichtparenchymalen Leberzellen zu prüfen und die Kultivierung von frisch präparierten Endothelzellen zu etablieren. Des weiteren wurde das bereits bestehende System zur hypoxischen Inkubation von Leberzellen modifiziert, der ICAM-1 Nachweis auf Endothelzellen etabliert und quantifizierbar gemacht.

Die aus der Leber von Ratten gewonnen Endothelzellen wurden auf die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 zunächst zum Startzeitpunkt als Äquivalent zur konstitutiven Expression dieses Moleküls bestimmt. Im folgenden Versuchsplan wurden Zellkulturen unter normothermen Bedingungen 6 Stunden einer Hypoxie ausgesetzt, anschließend 1 Stunde, 12 Stunden und 24 Stunden reoxiegeniert. Bei den Kontrollversuchen (Normoxie) wurden die Zellen konstant in normothermer, normoxischer Umgebung gehalten. Nach jedem Abschnitt wurde die Expression von ICAM-1 in beiden Ansätzen bestimmt und anschließend miteinander verglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Männliche Lewis (LEW)- Ratten	Charles River, Sulzfeld

2.2. Liste der Materialien

2.2.1. Chemikalien

Antikörper:	
-Maus anti Ratten CD 54	PharMingen, Hamburg
-Maus IgG1	Dako, Hamburg
-biotin-konjugierter Ziege anti-Maus	PharMingen, Hamburg
Aqua ad injectabilia	Ampuwa®,Fresenius, Bad Homburg
Carbogen (95% O_2, 5% CO_2)	Hans Mast, Tübingen
Collagenase CLS	seromed®, Biochrom, Berlin
Collagen CSP 0,3%	Pentapharm, Basel, Schweiz
Diethylether	Merck, Darmstadt
DNAse	Boehringer, Mannheim
Fötales Kälberserum	seromed®, Biochrom, Berlin
Gasgemisch (95% N_2, 5% CO_2)	Hans Mast, Tübingen
Gentamycin (10 mg/ml)	seromed®, Biochrom, Berlin
Glucose	Merck, Darmstadt
Hepes-Buffer (1M)	seromed®, Biochrom, Berlin
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid ($CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat ($MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$)	Merck, Darmstadt
N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin (200 mM)	seromed®, Biochrom, Berlin

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck, Darmstadt
Natronlauge 1M (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nykodenz	Life Technologies, Eggenstein
Paraformaldehyd 3%	Sigma, Deisenhofen
Pentobarbital-Natrium (Nembutal®)	WDT, Hannover
Phosphatgepufferte Saline (PBS)	seromed®, Biochrom, Berlin
Pronase E	Merck, Darmstadt
Propidium-Iodid Stammlösung	Sigma, Deisenhofen
RPMI-1640-Medium (1x) mit Phenolrot	seromed®, Biochrom, Berlin
RPMI-1640-Medium (1x) ohne Phenolrot	seromed®, Biochrom, Berlin
Salzsäure 1M (HCl)	Merck, Darmstadt
Serumalbumin vom Rind	Behring, Marburg
Streptavidin-FITC-Konjugat	PharMingen, Hamburg
Trypanblau-Lösung	seromed®, Biochrom, Berlin

2.2.2. Verbrauchsmaterial

Anaerobier-Indikator	Oxoid, Basingstoke, England
AnaeroGen®	Unipath, Hampshire, England
Auffanggefäß	Eigenbau, Vetter, Ammerbuch
Blasenfalle	Eigenbau,Werkstatt Chirurgische Klinik
Edelstahlfilter	Weisse& Eschrich, Ludwigsstadt
Einmalfilter	Falcon®, Becton Dickinson, USA
Erlenmeyer-Gefäße	Schott, Mainz
Infusionssysteme	Braun, Melsungen
Inkubator	Schott, Mainz
Ligaturfäden (Dexon II)	Braun-Dexon, Spangenberg
Mehrwegehähne	Discofix®, Braun, Melsungen
Oxygenator	Eigenbau, Vetter, Ammerbuch
Pipetten	Greiner, Frickenhausen

Spinalnadel	Becton-Dickinson, Heidelberg
Urglas	Schott, Mainz
Venenverweilkanüle 18G	Braun, Melsungen
Zellkulturplatten 3075	BD-Falcon, Heidelberg
Zellschaber	Costar, Cambridge MA,USA

2.2.3. Geräte

Durchflußzytometer (EPICS 5)	Coulter-Immunotech, Krefeld
Elutriator mit Standardkammer	Beckman, Palo Alto CA, USA
Fluoreszenz-Mikroplatten-Reader (Cytofluor II)	PerSeptive Biosystems, Wiesbaden
Mikroskop	Zeiss, Jena
Peristaltische Pumpe	Ismatec, Wetheim, Mondfeld
Sauerstoffelektrode	WTW, Weilheim
Wasserbad	Haake, Berlin-Lichterfelde
Zentrifuge	Rotixa / RP, Hettich, Tuttlingen

2.3. Präparation nicht-parenchymatöser Leberzellen

2.3.1. Vorbereitung der Präparation

Vor Beginn der Präparation wurde das RPMI-Medium mit 10 ml 1M Hepes-Puffer, 5 ml 200 mM N-Acetyl-L-alanyl-L-Glutamin und 2,5 ml Gentamycin supplementiert. Das zur Auflösung der Enzyme und zur Befüllung des Versuchsaufbaus verwendete RPMI-Medium wurde im Wasserbad bei 41° C 45 Minuten mit Carbogen begast, RPMI-Medium für die Elutriation wurde bei Raumtemperatur ebenfalls 45 Minuten mit Carbogen begast. Inzwischen erfolgte das Abwiegen der Enzyme: Enzym I: Pronase E 120 mg, Enzym II: Collagenase P052 37 mg, Enzym III: Pronase E 150 mg und DNAse 1 mg. Enzym I wurde nun in 100 ml, Enzym II in 75 ml des begasten RPMI-Mediums aufgelöst, indem zunächst das jeweilige Enzym in einem kleinen Teil der vorgesehenen Mediummenge gelöst wurde, diese dann durch einen sterilen Filter in die jeweils restliche Menge filtriert wurde. Die Auflösung des Enzyms III

fand erst kurz vor der Ausschabung der Zellen aus der Leber in 100 ml des Mediums statt, das inzwischen steril aufbewahrt wurde. Vor der Präparation der Ratte wurden die Leitungen des Präparationsaufbaus mit dem erwärmten Medium gefüllt.

Für die späteren Zentrifugationsschritte wurde das GBSS (Gey's Balanced Salt Solution) 4b hergestellt, indem man 0,225 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, 0,21 g $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$, 0,37 g KCl, 0,07 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0,133 g $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$, 0,03 g KH_2PO_4 und 0,981 g Glucose miteinander löste. Erst danach wurden 8 g NaCl und 0,227 g $NaHCO_3$ zur bisherigen Lösung hinzugegeben und mit Ampuwa auf ein Liter aufgefüllt. Der pH-Wert wurde zwischen 7,3 und 7,4 eingestellt. Abschließend wurden 5 ml Gentamycin hinzugefügt.

Zur Herstellung der 28,7 % Nykodenz-Lösung wurden 63,14 g Nykodenz in GBSS 4a auf ein Endvolumen von 220 ml gelöst und steril filtriert. Die Osmolarität lag bei 280 mosmol. Das GBSS 4a erhielt man durch das Zusammengeben von 0,225 g $CaCl_2 \cdot H_2O$, 0,21 g $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$, 0,37 g KCl, 0,07 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0,133 g $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$, 0,03 g KH_2PO_4, 0,981 g Glucose und zuletzt 0,227 g $NaHCO_3$. Diese Lösung wurde auf 1000 ml mit Ampuwa® aufgefüllt und der pH-Wert zwischen 7,25 und 7,35 eingestellt.

2.3.2. Präparation

Die Ratten wurden zuerst durch Inhalation von Diethylether, dann durch intraperitoneale Gabe von Nembutal® betäubt. Nach Überprüfung auf Erreichen einer ausreichenden Betäubung des Tieres wurden dessen Thorax und Abdomen mit Ethanol desinfiziert und anschließend die Bauchhöhle durch eine mediane Laparotomie eröffnet. Diese wurde durch zwei Schnitte entlang des linken und rechten Rippenbogens, sowie von zwei Schnitten links und rechts am Übergang der Bauchhöhle zum Becken erweitert. Die Eingeweide wurden nach rechts verlagert, um die Pfortader proximal und etwas weiter distal mit Nahtmaterial anzuschlingen. Die Pfortader wurde mit einer Venenverweilkanüle punktiert und bis über die proximale Anschlingung hinaus im Gefäß vorgeschoben. Nun wurden die Ligaturen geknotet und die Leber mit RPMI-

Medium mit einer Flussrate von 12 ml/min blutleer gespült. Währendessen erfolgte die Freipräparation der Leber von den umgebenden Strukturen, um danach an einem Stativ befestigt zu werden, so dass sie ganz leicht auf dem Locheinsatz des Auffang- und Rücklaufgefäßes zu liegen kam.
Anschließend wurde das aufgelöste Enzym I ohne Rezirkulation mit einer Flussrate von 12 ml/min durch die Leber perfundiert. Als Nächstes folgte die rezirkulierende Perfusion des Enzym II mit einer Flussrate von 32 ml/min über einen Zeitraum von 15-30 Minuten bis sich die Pfortader aufgelöst hatte.
Jetzt wurde die Leber mit Hilfe eines Zellschabers auf einem Urglas ausgestrichen, so dass die Leberzellen zusätzlich mechanisch aus ihrem Gewebeverband gelöst wurden. Nun erfolgte die Auflösung des Enzyms III, wovon ein kleiner Anteil zu den ausgestrichenen Zellen hinzugegeben wurde. Diese Suspension wurde durch einen sterilen Filter in die restliche Enzymlösung gegeben, die dann bei 37° C unter ständigem Rühren und Carbogenbegasung inkubiert wurde. Eine pH-Sonde diente der Kontrolle, dass der pH-Wert konstant zwischen 7,3 und 7,4 lag. Bei Abweichungen wurde mit 1N NaOH gegenreguliert.

2.3.3. Zentrifugationsschritte und Elutriation

Diese Zellsuspension wurde mit RPMI-Medium auf 200 ml aufgefüllt, dann mit 300 g, bei 4° C 10 Minuten mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen anschließend in 100 ml RPMI-Medium resuspendiert und erneut mit 300 g , bei 4° C 10 Minuten zentrifugiert. Erneutes Absaugen des Überstandes, Resuspension der Zellen in 50 ml bilanzierter Salzlösung (GBSS 4b) und Zentrifugation mit 300 g, bei 4° C für 10 Minuten. Das erhaltene Pellet wurde in 10 ml GBSS 4b resuspendiert und in gleicher Menge auf zwei Röhrchen verteilt. Zu beiden Suspensionen wurden je 7 ml Nykondenzlösung (28,7%) dazugegeben, gut vermischt und danach jeweils mit 1 ml GBSS 4b überschichtet. Die nächste Zentrifugation erfolgt bei 1400 g, bei 4° C für 20 Minuten ohne Bremse, so dass man eine Endothel- und Kupferzellbande zwischen der Nykodenz- und der GBSS 4b-Lösung erhielt. Diese Bande wurde

aus beiden Gefäßen abgenommen und in carbogenbegastem RPMI-Medium mit 1% FCS resuspendiert. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 300 g, 4° C, 10 Minuten mit Bremse. Der Niederschlag wurde erneut in 4-5 ml RPMI-Medium mit 1% FCS resuspendiert, davon wurde die Zellzahl vor Elutriation bestimmt und die restliche Suspension der Elutriation zugeführt.
Der Elutriator wurde bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 2500 rpm und bei 4° C mit in Eis gelagerter carbogenbegaster RPMI-Medium mit 1% FCS gefüllt. Danach wurde die Zellsuspension, die in einer Spritze aufgezogen war, in die Blasenfalle eingebracht, von wo aus sie in die Elutriationskammer gespült wurden. Dort fand bei konstanter Umdrehung und Temperatur durch Veränderung der Flussgeschwingkeit des Mediums die Zelltrennung statt (Tabelle 4). Dies geschieht, indem die nach außen gerichtete Zentrifugalkraft und die nach innen gerichtete, durch das Medium erzeugte Strömungskraft an jeder einzelnen Zelle angreift und die Zellen einer bestimmten Fraktion bei einer oder mehreren Flussgeschwindigkeiten von den restlichen Zellen trennt. Die Trennung erfolgt somit abhängig von der Größe der Zellen und der Flussgeschwindigkeit des Mediums.

Tabelle 4: Flussrate, Fraktionsgröße und Zelltyp der Elutriationsfraktionen.

Flussrate	Volumen	Fraktion
16 ml/ min	200 ml	Lymphozyten, Zellfragmente
18 ml/ min	50 ml	Endothelzellen
21 ml/ min	100 ml	Endothelzellen
25,5 ml/ min	100 ml	Zwischenfraktion
35 ml/ min	50 ml	Kupfferzellen
38 ml/ min	50 ml	Kupfferzellen
43 ml/ min	50 ml	Kupferzellen

Von den Zellsuspensionen der einzelnen Fraktionen wurden jeweils 500 µl für die Analyse mittels Durchflusszytometrie abgenommen, die restlichen Volumina wurden bei 300 g, 4° C, 10 Minuten mit Bremse zentrifugiert und die einzelnen Fraktionen in RPMI-Medium mit 10% FCS (Kupfferzellen) bzw. 20% FCS (Endothelzellen) resuspendiert. Hieraus wurden die Zellzahlen für die gewonnenen Endothel- und Kupfferzellen bestimmt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die Zellfraktionen mit ihrem speziellen Kulturmedium auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Für die Endothelzellen bestand dieses aus 500 ml RPMI-1640-Medium, supplementiert mit 20% FCS, 10 ml 1M Hepes-Puffer und 2,5 ml Gentamycin.

2.4. Durchflusszytometrie-Analyse

Dann wurden im Durchflußzytometer die Zellpopulationen anhand ihres vorwärtsgerichteten Streulichtes (forward scatter), welches proportional zur Zellgröße ist und anhand der Menge des seitwärtsgerichteten Streulichtes (side scatter), das proportional zur Zellgranularität ist, charakterisiert. Um dies zu messen wurden nach der Trennung durch Elutriation von jeder Zellart ein Aliquot mit mindestens $5 \cdot 10^4$ Zellen der Suspension entnommen und anschließend durch einen Stahlfilter (Porengröße 50 µm) in 500 µl phosphatgepufferte Saline gegeben.

2.5. Zellkultivierung

Die verwendeten 96-Loch Platten wurden mit verdünnter Kollagen-CSP-Lösung beschichtet, um den Endothelzellen das Anwachsen als Monolayer zu erleichtern. Durch Hinzufügen von Ampuwa® zur Kollagen-CSP-Stammlösung (0,3%) im Verhältnis 1:50 erhielt man die verdünnte Lösung, wovon in jedes Loch 50 µl pipettiert wurden. Anschließend saugte man die Flüssigkeit wieder ab, so dass der Boden der Vertiefung mit dem Kollagen benetzt blieb und trocknete die Platten für 30 Minuten unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur. Von den in Kulturmedium mit einer Dichte von $1 \cdot 10^6$

Zellen/ml suspendierten Endothelzellen wurden in jede Vertiefung 100 µl gegeben, so dass in jedes Loch ca.: $1 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät wurden. Die Zellen wurden anschließend im Zellschrank bei 37° C und 5% CO_2 ohne Medienwechsel kultiviert, bis sich nach 1-2 Tagen ein homogener Zellrasen gebildet hatte.

2.6. Versuchsansatz

Für die Hypoxie wurden die kultivierten Zellen in den luftdicht abschließbaren Inkubator (V=6,28 l) gestellt, 10 Minuten mit dem Gemisch 95% N_2/5% CO_2 begast, dann wurden pro Versuch 5 Beutel des Anaero-Gen® dazugegeben und der Inkubator erneut für 10 Minuten begast. Durch die Begasung mit 95% N_2/ 5% CO_2 sollte ein Sauerstoffgehalt unterhalb der Nachweisgrenze unserer Sauerstoffelektrode erzeugt werden. Das zugegebene Anaero-Gen® diente der sicheren Konstanthaltung dieser Bedingung. Zu deren Nachweis wurde ein Anaerobierindikator benutzt. Der Inkubator wurde in einem Trockenschrank bei einer Temperatur von 37° C (normotherm) gehalten. Nach 6 Stunden Hypoxie wurde das Kulturmedium von den Zellen abgegossen und in gleicher Menge durch Frisches ersetzt. Die Reoxigenierungsphase wurde im Brutschrank bei 37° C und 5% CO_2 durchgeführt.

Die normoxische Kontrolle blieb für die jeweilige Versuchsdauer ohne Unterbrechung im Brutschrank (37° C, normotherm), ein Medienwechsel fand nicht statt.

2.7. Zellfixierung und Antikörperfärbung

Nach Beendigung des Versuchs wurden die Zellen zweimal mit PBS (1x) gewaschen, dann durch Zugabe von 25 µl 3%-igem Paraformaldehyd pro Loch fixiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Unmittelbar vor Beginn der Färbeschritte wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS (1x) gewaschen. Der spezifischen Färbung liegt das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbung zugrunde. Dabei wird der erste Antikörper des Isotyps Maus-IgG-1, der gegen

das Rattenoberflächenmolekül ICAM-1 gerichtet ist mit dem zweiten Antikörper biotinylierter Maus-Antikörper gekoppelt, um im nächsten Schritt das Streptavidin-FITC-Konjugat zu binden. Dadurch ergibt sich eine Fluoreszenz, die abhängig ist von der tatsächlich vorhandenen ICAM-1 Dichte. Der Antikörper für ICAM-1 wurde im Verhältnis 1:150, die Kontrolle mit IgG-1 1:540 mit PBS und 3% RSA suspendiert. Somit erhielt man für ICAM-1 und IgG-1 dieselbe Proteinmenge pro Loch einer Kulturplatte. Die Inkubationszeit für den ersten Antikörper (25 µl pro Loch) betrug 1 Stunde auf Eis, danach erfolgte ein zweimaliges Waschen mit PBS (1x). Der zweite Antikörper wurde im Verhältnis 1:50 mit PBS und 3% RSA gemischt, je Loch wurden 25 µl für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen wieder mit PBS (1x) zweimal gewaschen. Das fluoreszierende FITC-Konjugat wurde mit PBS und 3% RSA 1:200 verdünnt, die Kulturplatten in lichtundurchlässigen Behältern auf Eis 45 Minuten mit diesem inkubiert. Danach erfolgte ein zweimaliges Waschen mit PBS (1x), zur Messung wurden in jedes Loch 100 µl PBS (1x) gegeben.

2.8. Messung der Fluoreszenz des FITC-Konjugates

Mit Hilfe des Fluoreszenz-Messgerätes (Cytofluor II) konnte die Expressionsdichte von ICAM-1 und die Dichte von IgG-1 bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 530 nm gemessen werden. Das Gerät nahm pro Loch 2 Messungen vor, der Mittelwert dieser Doppelbestimmung wurde als endgültiger Wert angegeben. Gleichzeitig wurde die Hintergrundsfluoreszenz, die von der ohne Zellen behandelten Platte ausging, bestimmt.

2.9. Propidiumjodidfärbung

Um die gemessenen Fluoreszenz auf die tatsächlich vorhandene Zellmenge in Beziehung zu setzten wurden die Zellen mit Propidiumjodid gefärbt. Von den Kulturplatten wurde das PBS abgenommen und pro Loch mit 25 µl der 1:600

verdünnten Propidiumjodid-PBS-Lösung für 20 Minuten in lichtundurchlässigen Behältern inkubiert.

2.10. Messung der Propidiumjodidfluoreszenz

Die Messung erfolgte mit dem Cytofluor II Gerät bei einer Exzitation von 530 nm und einer Emission von 645 nm. Zur Bestimmung der Hintergrundsfluoreszenz wurde die ohne Zellen mitbehandelte Platte gemessen.

2.11. Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm JMP in der Version 4.0.0. (SAS Institute Inc., Cary NC, USA) verwendet.

Aus den Rohdaten wurden zunächst die Mittelwerte und die Standardabweichungen für die Hintergrundfluoreszenz berechnet, wobei bei einem Versuch ein Mittelwert für die ICAM-1 und IgG-1 Färbung von 246 ± 13 aus n=40 Werten bestimmt werden musste, da dieser von der Höhe der Werte deutlich unterschiedlich zu den restlichen Versuchen war. Der Mittelwert des allgemeinen Hintergrundes lag für ICAM-1 und IgG-1 bei n=191 Werten bei 322 ± 16 (Ex: 485 nm, Em: 530 nm) und für die Propidiumjodidfärbung dieser bei n=382 Werten bei 65 ± 4 (Ex: 530 nm, Em: 645 nm). Die jeweiligen Hintergrundwerte wurden von den Rohdaten der hypoxischen und normoxischen Versuche für ICAM-1, IgG-1, PJ-ICAM-1 und PJ-IgG-1 zu allen Zeitpunkten abgezogen. Ausgehend von den hintergrundsbereinigten Werten wurde die absolute ICAM-1 Dichte [ICAM-1 - IgG-1 (unspezifische Proteinbindung)], sowie die relative ICAM-1 Dichte (ICAM-1÷PJ-ICAM-1 – IgG-1÷PJ-IgG-1) für Hypoxie und Normoxie berechnet. Diese wurden in Form von Mittelwerten und des dazugehörigen Standardfehlers angegeben. Geordnet nach den einzelnen Zeitpunkten wurde nun mit Hilfe des Wilcoxon/ Kruskal-Wallis-Test (1-way Test, ChiSquare Approximation) geprüft, ob signifikante Unterschiede ($p<0,05$) zwischen der Hypoxie und der Normoxie bestanden. Für die Ermittlung der Wertedifferenz zwischen Hypoxie und deren Kontrolle

(Normoxie) wurden die obengenannten Mittelwerte und Standardfehler herangezogen, die ermittelten Werte wurden ebenso als Mittelwert und Standardfehler angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Präparation

Die mittlere Zellzahl, die man durch die Präparation einer Rattenleber mit anschließenden Zentrifugationsschritten, zuletzt der Dichtezentrifugation mit Nykodenz, erhielt, lag bei $1,6 \pm 0,7 \cdot 10^8$ Zellen. Nach der Elutriation entfielen auf die Endothelzellfraktion im mittel $3,8 \pm 1,8 \cdot 10^7$ Zellen und auf die Kupfferzellfraktion $2,7 \pm 1,2 \cdot 10^7$ Zellen.

3.2. Charakterisierung der nichtparenchymalen Zelltypen

Da bei der Zellpräparation die Enzyme Pronase und Collagenase verwendet wurden, konnte eine Färbung spezifischer Oberflächenstrukturen der Kupffer- und Endothelzellen nicht durchgeführt werden. Aufgrund dessen musste die Typisierung der Zellen anhand andersgearteter Charakteristika und Methoden vorgenommen werden. Die nach Dichtezentrifugation mit Nykodenz erhaltene Zellsuspension wurde mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht. Dabei konnten verschiedene Zellfraktionen ausgemacht werden, die eine unterschiedliche Zellgröße (vorwärtsgerichtetes Streulicht) und eine unterschiedliche Granularität (seitwärtsgerichtetes Streulicht) als Charakteristika aufwiesen (Abbildung 4), sowie durch unterschiedlich starker Autofluoreszenz bei einer Wellenlänge von 525 nm zu unterscheiden waren (Abbildung 5).

Nach der Elutriation wurden die Zellfraktionen anhand der Zellgröße, der Zellgranularität, der Autofluoreszenz, sowie anhand der verschiedenen Flussgeschwindigkeiten des Mediums bei Elutriation charakterisiert (Lymphozyten, Endothelzellen, Zwischenfraktion und Kupfferzellen) und auf ihren Reinheitsgehalt untersucht. Die Reinheit der Zellfraktionen lag bei > 90 % (Abbildung 6).

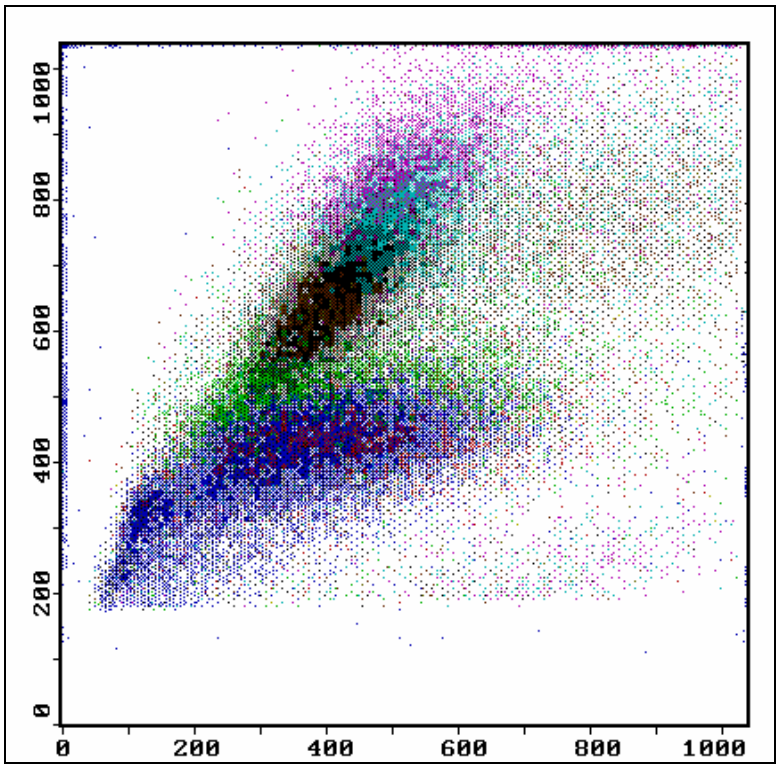


Abbildung 4: Scatter-Plott FS gegen SS der Zellsuspension nach der Dichtezentrifugation

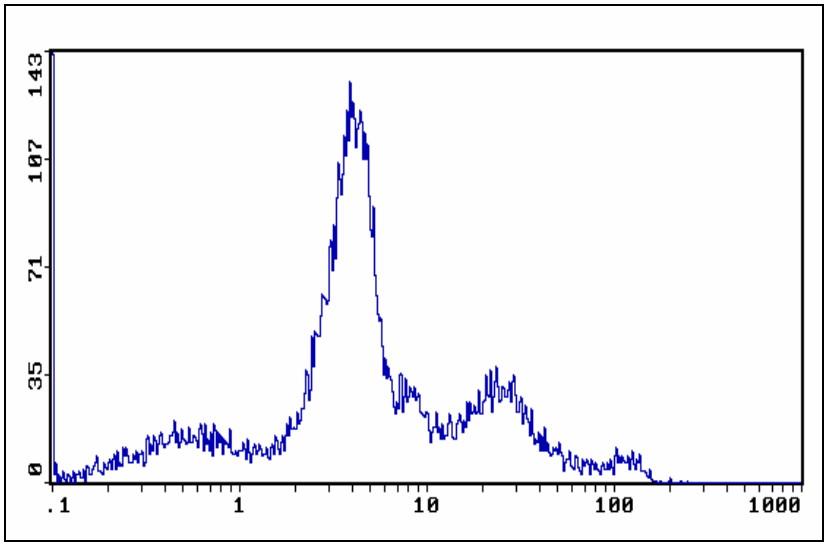


Abbildung 5: Autofluoreszenz der Zellsuspension nach Dichtezentrifugation

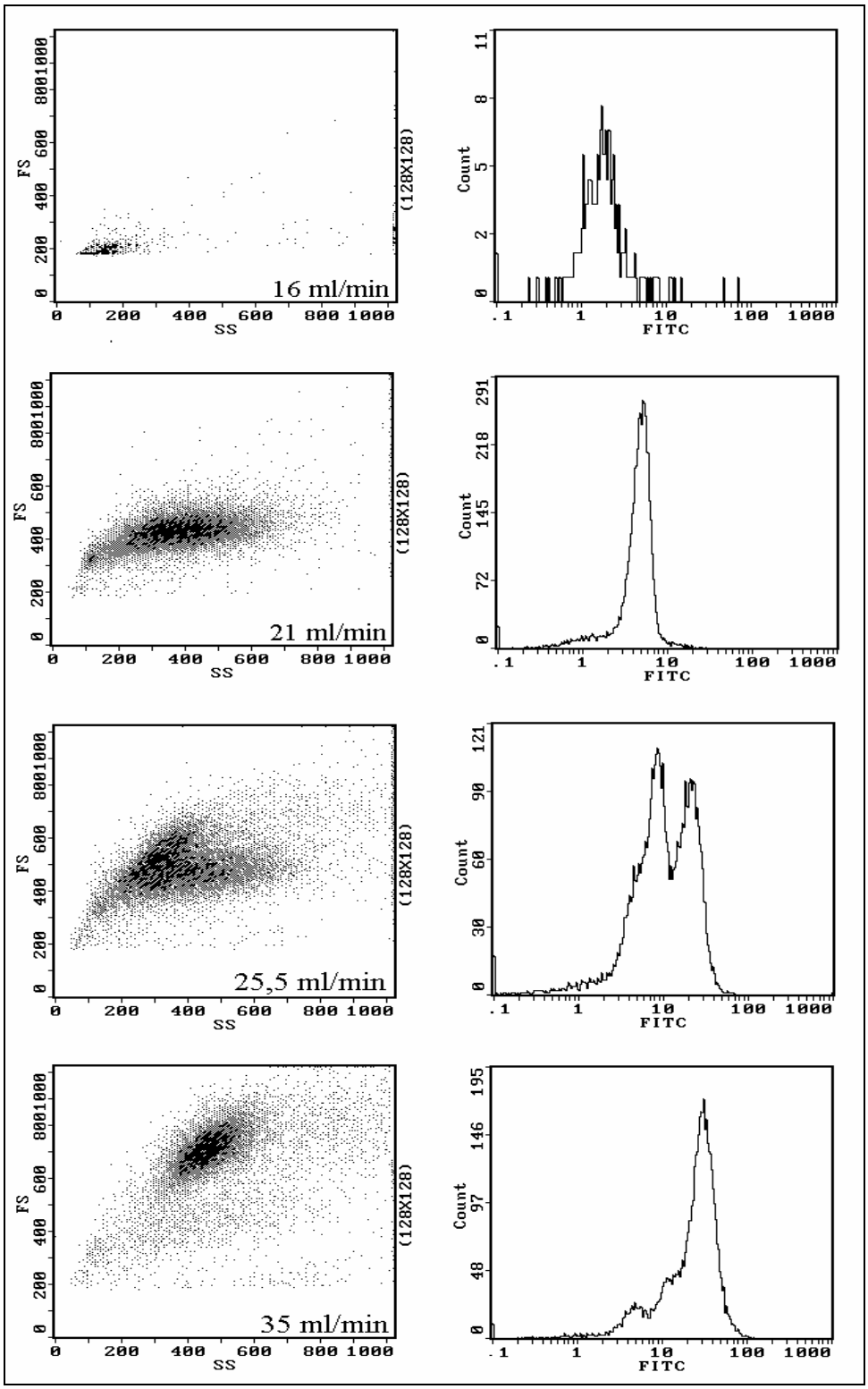


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Analyse der Elutriationsfraktionen der Flussraten (von oben): 16 ml/min (Lymphozyten und zerstörte Zellen), 21 ml/min (Endothelzellfraktion), 25,5 ml/min (Mischfraktion) und 35 ml/min (Kupfferzellfraktion).

3.3. Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen

Bei den Kulturen von Endothelzellen wurde die Expressionsdichte von ICAM-1 sowie die Dichte von IgG-1, als Maß für die unspezifische Färbung, bei einer 6-stündigen Hypoxie und 24-stündigen Reoxigenierungsphase des weiteren bei einer durchgehend normothermen Normoxie, zu jeweils gleichen Zeitpunkten gemessen. Nach der Kultivierung der Zellen wurde zum Zeitpunkt t=0 h die Expressionsdichte von ICAM-1 bestimmt und davon die Dichte von IgG-1 abgezogen. Diese Differenz der Dichten wurde für alle Zeitpunkte und für die jeweiligen Ansätze (Hypoxie/ Normoxie) ermittelt (Abbildung 7). Für die normotherme Hypoxie betrug diese 73 ± 6 (n=84), für die normotherme Normoxie 60 ± 6 (n=64). Dabei war der Unterschied mit p=0,04 signifikant. Nach 6-stündiger Hypoxie fiel die Expressionsdichte deutlich auf 41 ± 5 ab (n=75). Die Normoxie zeigt dahingegen einen geringen Abfall der Dichte auf 52 ± 4 (n=63), was eine signifikante Differenz (p=0,03) bedeutete.

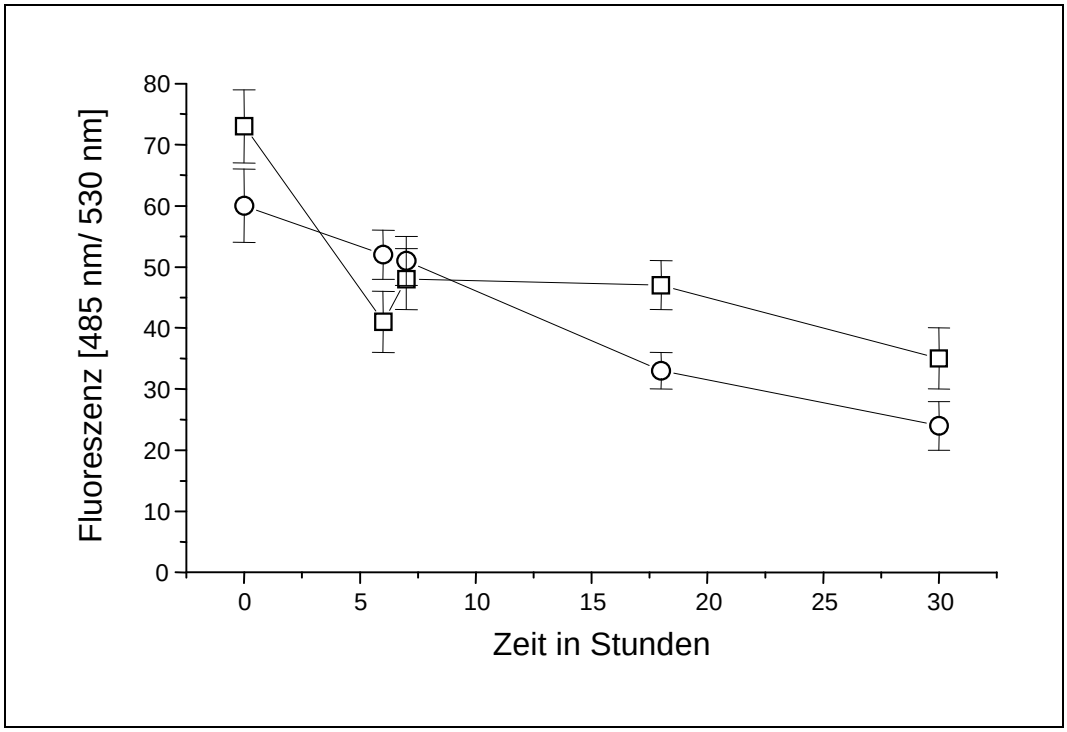


Abbildung 7: Absolute ICAM-1 Dichte gegen Stundenzahl aufgetragen,

□:Hypoxie, O: Normoxie (Kontrolle);(Mittelwert ± Standardfehler).

Im weiteren Verlauf zeigte sich, dass die Dichte nach Hypoxie und nach 1-stündiger normothermer Reoxigenierung (t=7 h) mit einem Wert von 48 ± 5 (n=76) einen leichten Anstieg verzeichnete, nach 12-stündiger Reoxigenierung (t=18 h) mit einer Dichte von 47 ± 4 (n=76) etwa gleich blieb und dann nach der Gesamtversuchsdauer von 30 h auf 35 ± 5 (n=76) abfiel. Die normoxische Kontrolle blieb bei t=7 h mit 51 ± 4 (n=64) konstant, fiel dann bei einer Versuchsdauer von 18 h auf 33 ± 3 (n=66) und bei 30 h nochmals auf 24 ± 4 (n=65) ab. Lediglich nach 18 h war der Unterschied zwischen Hypoxie und Normoxie erneut signifikant (p=0,04).

Wurde nun die Expressionsdichte von ICAM-1 auf die Kontrolle bezogen dargestellt (Abbildung 8), zeigte sich zum Zeitpunkt t=0 h eine Dichte im positiven Bereich (13 ± 8), die unter 6-stündiger Hypoxie mit -11 ± 6 deutlich unter den Kontrollwert abfiel. Bei nachfolgender Reoxigenierungszeit von 1 h war ein leichter Anstieg der Dichte zu verzeichnen (-3 ± 6), der jedoch immer noch im negativen Bereich lag.

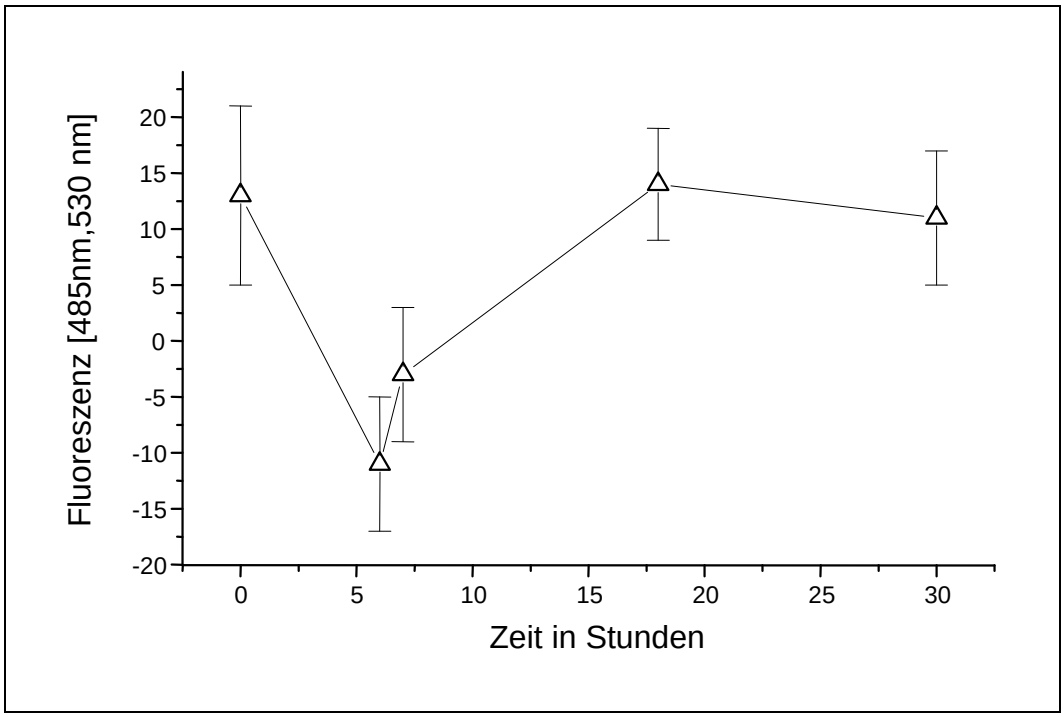


Abbildung 8: Differenz der absoluten ICAM-1 Dichte von Hypoxie und Normoxie (Mittelwert ± Standardfehler).

Allerdings stieg die Dichte nach 12 h Reoxigenierung minimal über das Ausgangsniveau an und lag somit zu diesem Zeitpunkt deutlich über der Kontrolle (14 ± 5). Bei der Versuchsdauer von 30 h wurde erneut ein leichter Abfall sichtbar, dennoch lag dieser Wert oberhalb der Kontrolle (11 ± 6).

Bezog man die einzelnen Expressionsdichten von ICAM-1 und IgG-1 auf die jeweils entsprechende Zelldichte und bildete dann die Differenz (Abbildung 9), zeigte sich ein annähernd gleicher Ausgangswert für die Hypoxie (0,98 ± 0,07; n=84) und die Normoxie (1,02 ± 0,1; n=64). Nach 6-stündiger Hypoxie fiel dieser Wert auf 0,75 ± 0,07 bei n=75 ab, was einen signifikanten Unterschied (p=0,02) zur Normoxie zeigte, die nach 6 Stunden fast identische Werte im Vergleich zu ihrem Ausgangswert mit 0,96 ± 0,07 (n=63) aufwies. Beim Zeitpunkt t=7 h lagen Hypoxie und Normoxie fast gleich bei 0,84 ± 0,07 (n=76) und 0,88 ± 0,07 (n=64). Für die Hypoxie bedeutete dies ein kurzer Anstieg der Dichte im Vergleich zum Zeitpunkt t=6 h, die Normoxie war im Vergleich zu ihrem letzten Wert abgesunken. Dieser Trend setzte sich bei der Normoxie für den 18-h-Wert und den 30-h-Wert mit 0,74 ± 0,07 (n=66) und mit 0,46 ± 0,05 (n=65) weiter fort.

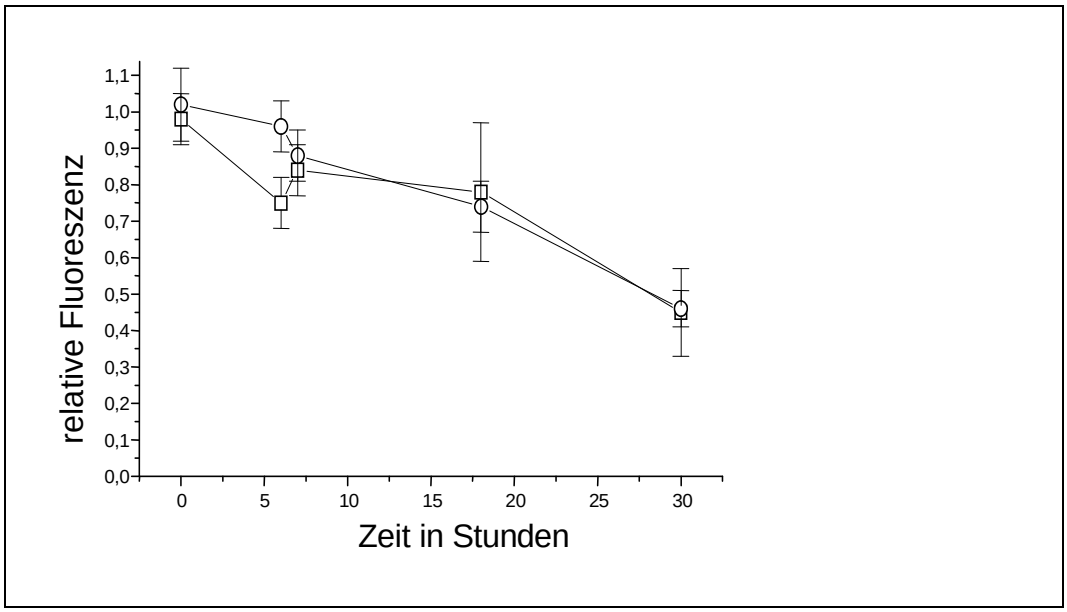


Abbildung 9: Relative Fluoreszenz: Absolute ICAM-1 Dichte bezogen auf die Zelldichte, □: Hypoxie, O: Normoxie, (Mittelwert ± Standardfehler).

Der 18 Stunden-Wert für die Hypoxie fiel leicht auf 0,78 ± 0,19 (n=76) ab, dieser war signifikant unterschiedlich zur Normoxie (p=0,02) und erreichte nach 30 h seinen Tiefpunkt bei 0,45 ± 0,12 (n=71).

Bei t=0 h zeigte sich für die Hypoxie, ins Verhältnis gesetzt zur Normoxie, eine ICAM-1 Expressionsdichte von -0,04 ± 0,12, die somit unterhalb der Kontrolle lag. Die Hypoxie über 6 Stunden verringerte die Dichte auf -0,21 ± 0,1 unter den Kontrollwert. Die einstündige Reoxigenierung bewirkte einen Dichteanstieg auf den Ausgangswert von -0,04 ± 0,1. Nach 18 h lag der Wert bei 0,04 ± 0,2, d.h. erstmals über der Kontrolle. Zum Zeitpunkt t=30 h war der Wert erneut auf -0,01 ± 0,13 abgefallen. Insgesamt liegt also die ICAM-1-Dichte normiert auf die Zelldichte nur bei t=18 h über der Kontrolle, wobei der bestimmte Standardfehler recht groß war (Abbildung 10).

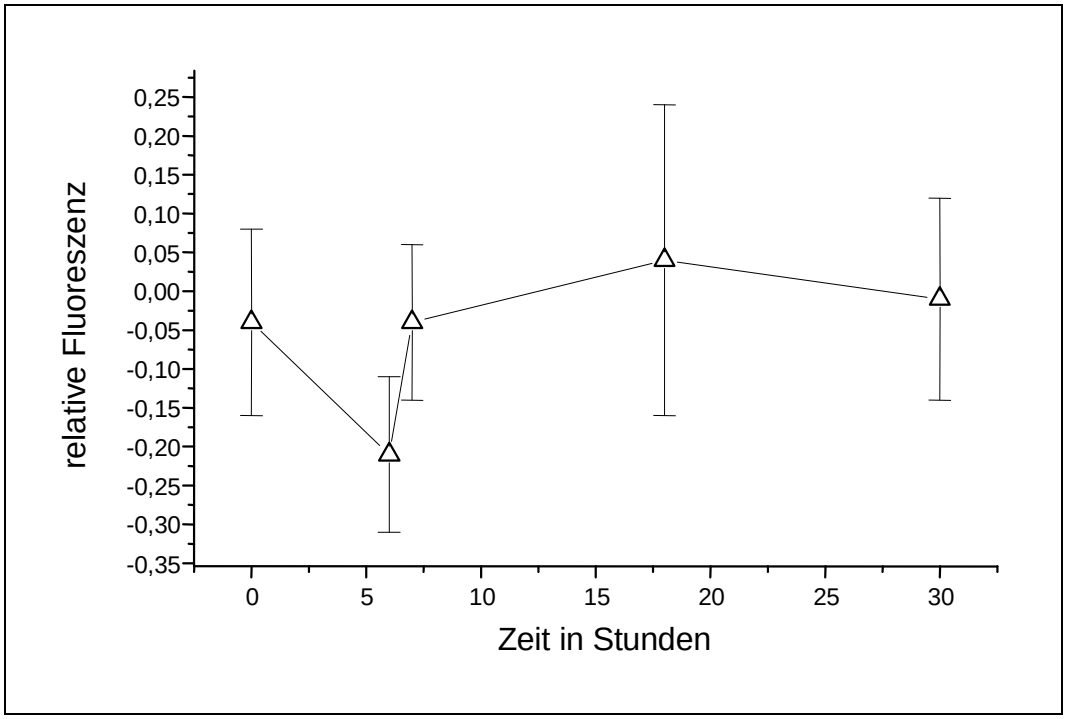


Abbildung 10: Differenz der relativen Fluoreszenz von Hypoxie und Normoxie (Mittelwert ± Standardfehler).

4. Diskussion

4.1. Zellmodelle

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurde ein Zellmodell gewählt: dieses bestand aus Kulturen von isolierten Endothelzellen, die von Rattenlebern stammten. Ein Zellmodell stellt einerseits eine Aufhebung des eigenen Zellverbandes sowie des ursprünglichen Nachbarschaftsverhältnisses zu einer Vielzahl von anderen Zellen dar („in vivo-Situation“), bietet aber andererseits die Möglichkeit einen wissenschaftlichen Fokus auf nur ein „Objekt“ zu richten („in vitro-Situation“). Im Bezug auf die Ergebnisse muss natürlich zusätzlich berücksichtigt werden, dass sich Endothelzellen der Ratte möglicherweise nicht genau gleich verhalten wie isolierte Endothelzellen eines Menschen. Eine Gewinnung menschlicher Endothelzellen der Leber würde nur durch eine Leberteilresektion möglich werden, die allerdings bei Gesunden ethisch keineswegs zu rechtfertigen wäre. Eine Verwendung von Teilresektaten von leberkranken Patienten kommt hierfür ebenso nicht in Frage, da viele Untersuchungen gezeigt haben, dass ICAM-1 während einer Entzündung auf so gut wie allen Leberzellen stark hochreguliert ist (Jaeschke, H., 1997). Ein weiterer Aspekt der Diskussion beinhaltet die Erkenntnis, dass das Molekül ICAM-1 z.B. von Ratten oder Kaninchen im Vergleich zum Menschen bezogen auf die cDNA-Sequenzen nur eine begrenzte Homologie von 55-65% aufweist (van de Stolpe A et al., 1996). Allerdings liegen keine Angaben über die Homologie der exprimierten Moleküle beider Spezies vor.

Endothelzellen

Es gibt wenig Arbeitsgruppen, die mit isolierten Endothelzellen arbeiten. Hierbei stellt sich natürlich die Frage nach den Gründen.
Eine Unsicherheit im Umgang mit isolierten Zellen liegt sicher in der Frage begründet, inwiefern die Isolationsmethoden, inklusiv verwendeter Enzyme und physikalischer Manipulationen die ursprünglichen Eigenschaften der Zelle

modifizieren. Diese Frage stellt sich dagegen zum Beispiel auch für die Fixierungsbehandlung von Leberbiopsieschnitten.

Die Verwendung von Endothelzellkulturen bietet die Möglichkeit die Eigenschaften dieser Zellen anhand des Oberflächenmoleküls ICAM-1 unter verschiedenen Bedingungen näher zu beschreiben und zu quantifizieren. Die erhaltene Aussage ist dann folglich unabhängig vom Einfluss anderer Faktoren, wie zum Beispiel von anderen Zellen (z.B. Leukozyten oder beeinflussende Chemo-, Zytokine). Ein Nachteil der „in vitro"-Untersuchungen besteht darin, dass die Ergebnisse nicht unreflektiert über mögliche Differenzen zu der „in vivo"-Situation übertragen werden können. Des weiteren spielt erneut die Speziesdifferenz der Zellen eine nicht zu vernachlässigende Bedeutung, wie bereits erwähnt unter Zellmodelle.

Die Verwendung von Biopsiematerial, v.a. von menschlichen Lebern oder Blutmaterial zeichnet eher ein Gesamtbild einer Situation, die auf einen Aspekt fokussiert werden kann, allerdings das Ausmaß einzelner Einflussfaktoren nicht klar quantifizieren kann wie jedoch im Zellmodell möglich. Allerdings leisten sie ebenso einen unverzichtbaren Beitrag in der Verständnisbildung einer Fragestellung.

4.2. Ergebnisse

4.2.1. Elutriation

In der Arbeit von Knook DL et al. (1976) wird die Trennung von Kupffer- und endothelialen Zellen von Rattenlebern durch Elutriation dargestellt. In der Zellsuspension vor Elutriation befand sich eine Gesamtzahl von $217 \pm 16 \cdot 10^6$ Zellen (Zellzahl von 2 Rattenlebern). Nach der Elutriation entfielen auf die Endothelzellfraktion $161 \pm 9 \cdot 10^6$ Zellen und auf die Kupfferzellfraktion $36 \pm 2 \cdot 10^6$ Zellen (Zellzahl von 2 Rattenlebern).

In der Zellfraktion I, die bei einer Flussrate des Elutriators von 22,5 ml/min erhalten wurde, fanden sich 95% endotheliale Zellen.

Bei einer Flussrate von 42,4 ml/min wurde die Zellfraktion II gesammelt, die zu 91% aus Kupfferzellen bestand.

Vergleicht man nun die Ergebnisse von Knook DL et al. (umgerechnet auf eine Rattenleber) mit denen dieser Arbeit, so zeigt sich hier eine ca. 30 % höhere Gesamtzahl an Zellen vor Elutriation.

Nach der Elutriation war die Zellausbeute bei der Arbeitsgruppe von Knook et al für die Endothelzellen ca. doppelt so hoch, für die Kupfferzellen ca. 30 % niedriger als in der vorliegenden Arbeit.

Die hier verwendeten Endothelzellen wurden bei einer Flussrate von 18 und 21 ml/min gewonnen, wohingegen Knook et al eine Flussrate von 22,5 ml/min benutzte. Bei Knook et al. lag die Flussrate für die Fraktion der Kupfferzellen bei 42,4 ml/ min, im Gegensatz dazu wurde bei der vorliegenden Arbeit eine Flussrate von 35, 38 und 43 ml/ min gewählt.

Die Unterschiede in den Gesamtzellzahlen und den Einzelzellfraktionen können einerseits aus den abweichenden Methoden der Zellgewinnung, z.B. verwendete Enzyme, resultieren sowie andererseits auf die unterschiedlichen Flussraten bei der Elutriation zurückzuführen sein. In der vorliegenden Arbeit wurde pro Zellfraktion mehr als eine Flussrate verwendet, so dass möglicherweise zumindest für die Kupfferzellfraktion mehr Zellen aus der ursprünglichen Zellsuspension vor Elutriation gewonnen werden konnten. Erstaunlicherweise ist die Zellzahl für die endothelialen Zellen bei der Arbeitsgruppe von Knook et al. sehr hoch, dabei könnte man vermuten, dass bei der verwendeten Flussrate ein Maximum an endothelialen Zellen zu gewinnen ist.

4.2.2. Untersuchung der Expressionsveränderungen

Vergleicht man die absolute ICAM-1 Dichte des hypoxischen Ansatzes mit der Kontrolle (Normoxie) so zeigt sich für die Hypoxie ein deutlich erhöhtes Ausgangsniveau. Nach 6-stündiger Hypoxie fällt diese Dichte deutlich ab, unter Reoxigenierung kommt es zunächst zur reaktiven Hochregulation von ICAM-1,

am Endpunkt des Versuches nimmt die Dichte wieder ab. Die Kontrolle wird bei den letzten beiden Zeitpunkten des Versuches überschritten, dabei wird allerdings ungefähr das Differenzniveau des Startzeitpunktes erreicht. Die genannten Unterschiede sind eher geringer Natur und zu den Zeitpunkten t=0 h, t=6 h und t=18 h signifikant.

Der signifikante Unterschied des Ausgangswertes zwischen Hypoxie und der negativen Kontrolle (Normoxie) könnte auf der Tatsache beruhen, dass die jeweilige Fluoreszenz nicht auf die Zelldichte bezogen wurde. Somit könnte im Falle der Hypoxie zum Zeitpunkt t=0 eine höhere Zelldichte als bei der Normoxie vorgelegen haben.

Unter Einbeziehung der Zelldichte zeigt nun die relative ICAM-1 Expression einen annähernd gleichen Ausgangspunkt für die Hypoxie und die Kontrolle (Normoxie). Nach 6-stündiger Hypoxie fällt die relative ICAM-1 Dichte deutlich ab, um bei der Reoxigenierung reaktiv hochreguliert zu werden. Die Kontrolle wird nur nach 12-stündiger Reoxigenierung marginal überschritten, am Ende des Versuches kommen beide Ansätze am selben Punkt an. Lediglich zu den Zeitpunkten t=6 h und t=18 h waren die Unterschiede rechnerisch signifikant.

4.2.3. Experimentelle Studien

Über die ICAM-1 Veränderungen auf isolierten Endothelzellen unter 6 stündiger hypothermer Hypoxie und anschließender normothermer Reoxigenierung (1 Stunde) berichtet Schenk M (1999) zunächst eine tendenzielle Erhöhung der Expressionsdichte, die sich nach 30 Stunden (24 Stunden Reoxigenierung) dann deutlich und signifikant erhöht.
In der vorliegenden Arbeit fand sich dagegen eine deutliche Expressionsverminderung von ICAM-1 während der normothermen Hypoxie, mit kurzer reaktiver Hochregulation unter Reoxigenierung ohne jedoch die negative Kontrolle ganz deutlich zu überschreiten (relative Dichte).

Möglicherweise begründet sich die unterschiedliche Reaktion der isolierten Endothelzellen durch die normotherme Hypoxie (37° C) im Gegensatz zur hypothermen Hypoxie von M. Schenk. Dabei scheint die hypotherme Hypoxie eine intrinsische ICAM-1 Hochregulation auszulösen, wohingegen die normotherme Hypoxie dies anscheinend nicht zu leisten vermag, sondern sogar die ICAM-1 Expressionsdichte noch vermindert. Es muss in Betracht gezogen werden, dass die normotherme Hypoxie über bislang unbekannte Mechanismen eine Abspaltung des extrazellulären Anteils des Moleküls bedingt.

Eine Untersuchung über den Einfluss von warmer Ischämie und Reperfusion auf die ICAM-1 Expression auf Rattensinusendothelzellen der Leber wurde von der Arbeitsgruppe um Kojima N (2001) vorgestellt. Diese Gruppe führte Versuche an Ratten durch, wobei die Leberarterie und die Portalvene des linken lateralen und des mittleren Lappens für 30 bzw. 60 Minuten abgeklemmt wurden (Ischämie) und eine Reperfusion von 24 Stunden durchführten. Anschließend wurden Kryoschnitte der entnommenen Leberanteile gefärbt. Die Ergebnisse ihrer Untersuchung zeigten eine eher konstitutive Expression von ICAM-1 auf ihrer Kontrolle, eine leicht erhöhte ICAM-1 Expression wurde im rechten Leberlappen beobachtet, und eine weitere Erhöhung fand sich in den linken Lappen 24 Stunden nach warmer Ischämie/ Reperfusion.

Bei der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich eine konstitutive Expression von ICAM-1 auf beiden Ansätzen zum Zeitpunkt t=0 h. Auch die Arbeitsgruppe um Kojima beschreibt diese auf ihren Kontrollen, allerdings handelt es sich hierbei um Tiere, die einer simulierten Operation (sham-operated) unterzogen wurden. Dabei ist unklar ob und wenn ja welchen Einfluss diese Prozedur auf die Expression des Moleküls hat. Vergleicht man nun die einzelnen Verläufe der Expressionsdichte von ICAM-1, so ergibt sich eine widersprüchliche Aussage. Anzumerken ist, dass bei Kojima et al. keine Untersuchung der ICAM-1 Expression direkt nach Ischämie durchgeführt wurde, zusätzlich sind die Ischämiezeiten sehr different. Es ist eher wahrscheinlich, dass die Ischämiezeitdauer ebenso einen Einfluss auf die Expression hat. Weiterhin

muss bedacht werden, dass es sich bei dem Versuchsansatz der Arbeitsgruppe von Kojima N et al. (2001) um ein „in vivo“ durchgeführtes Experiment handelt im Gegensatz zu der hier dargestellten Arbeit, die „in vitro“ Experimente bzw. Einzelzellkulturexperimente benützt. Ein „in vivo“ Experiment schließt immer Wechselwirkungen zu umgebenden anderen Zellen mit ein. Die Unterschiede könnten sich folglich durch Faktoren wie zum Beispiel lokale Mikrozirkulationsstörungen (mit sukzessiver Aktivierung des Endothels), sowie durch Zytokine erklären lassen. Untersuchungen zu diesem Themenbereich führte die Arbeitsgruppe um Ohira H. et al (1994) durch. Sie verwendeten sinusoidale Endothelzellen, die aus Rattenlebern gewonnen wurden. Dabei zeigte sich, dass die mittleren Fluoreszenzintensitätswerte von ICAM-1 auf sinusoidalen Endothelzellen , die mit TNF-α oder mit IL-1α für 8 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen behandelt wurden im Vergleich zu den Kontrollen signifikant und dosisabhängig erhöht waren.

Eine sehr schöne und differenzierte Arbeit über den Einfluss der kalten Ischämie sowie der kalten Ischämie/ Reperfusion auf die ICAM-1 Expression auf Leberbiopsieschnitten der Ratte wurde von der Arbeitsgruppe El-Wahsh M et al., 2003 vorgestellt. Bei der Kontrolle zeigte sich nur eine minimale ICAM-1 Expression, die Färbungen der Schnitte von durchspülter Leber mit anschließender 0 h bzw. 8 h kalter Ischämie zeigten keine signifikante Expressionserhöhung von ICAM-1. Verlängerte man allerdings die kalte Ischämiezeit auf 16 h und 24 h, wurde die ICAM-1 Expression in beiden Fällen signifikant hochreguliert.

Dies lässt den Schluss zu, dass ein signifikanter Effekt auf die ICAM-1 Expression erst nach ca. 16 Stunden Ischämie auftreten würde.
Die in der aktuellen Arbeit vorgestellten Versuche zeigten dahingegen, dass bereits nach 6-stündiger normothermer Hypoxie die ICAM-1 Expression deutlich zurückgeht. Die unterschiedlichen Ergebnisse resultieren wahrscheinlich erneut aus den differenten Hypoxieformen (kalte versus normotherme Ischämie). Des weiteren verwendete die Arbeitsgruppe um El-Wahsh ganze Lebern, die den

Einfluss von lokal vorhandenen Substanzen wie Zytokine mit beinhaltet. Die Färbungsintensitäten auf sinusoidalen Endothelzellen und Hepatozyten wurden semiquantitativ erfasst. Entsprechend der Färbungsintensität wurde die ICAM-1 Expression in 4 Kategorien eingeteilt.

Im zweiten Teil derselben Studie wurde die Ausgangs-ICAM-1 Expression (anhand der Biopsie zum Zeitpunkt der Laparotomie) für jeden Versuchsansatz bestimmt, sowie die ICAM-1 Expression nach 0 h, 8 h, 16 h und 24 h dauernder kalter Ischämie und jeweils folgender 60 minütiger Reperfusion erneut bestimmt. In allen Gruppen konnte eine signifikante Erhöhung der ICAM-1 Expression nach warmer Reperfusion im Vergleich zur Ausgangsexpression beobachtet werden. Die Expressionserhöhung in Lebern mit 16-stündiger und 24-stündiger kalter Ischämie fiel statistisch gesehen deutlicher aus.

Will man nun die hier vorliegenden Ergebnisse mit der Studie von El-Wahsh et al. vergleichen, so muss man die ICAM-1 Expression der Hypoxie zum Zeitpunkt t=0 h als Ausgangsexpression festlegen und diese mit den Werten des hypoxischen Ansatzes (6 stündige Hypoxie) nach unterschiedlichen Reoxigenierungszeiten vergleichen. Gemeinsam ist beiden Untersuchungen eine konstitutive bzw. Ausgangsexpression (baseline expression) von ICAM-1, wobei diese bei der Arbeitsgruppe von El-Wahsh ungünstigenfalls auf 0 absinken kann.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte ICAM-1 Expression zeigt nach dem Abfall nach 6 stündiger Hypoxie zwar eine reaktive Hochregulation, diese überschreitet aber nicht die Ausgangsexpression von ICAM-1. Somit stehen diesbezüglich die Ergebnisse im Gegensatz zu der Arbeitsgruppe von El-Wahsh.

Auch diese Differenzen in den Ergebnissen lassen sich durch die unterschiedlichen Hypoxieformen und wahrscheinlich noch viel mehr durch die unterschiedlich verwendeten Systeme (Zellkultur versus ganze Lebern) erklären.

4.2.4. Klinische Studien

Die Arbeitsgruppe um Bhargava A et al. (1995) untersuchte die ICAM-1 Expression auf Leberallotransplantatbiopsien zu verschiedenen Zeitpunkten: vor Explantation, vor und nach kalter Lagerung und nach Reperfusion. Normale Kontrollen beinhalteten Lebern und Biopsien von Langzeit stabilen Transplantaten, beide von welchen die histologisch normal waren und die gleichartige ICAM-1 Expression hatten.

Auf 10 von 12 Donor-Leberbiopsien (83,3%), die vor der Explantation entnommen wurden, zeigte sich im Vergleich zu den normalen Kontrollen eine gleichartige ICAM-1 Expression. Alle 10 Biopsien, die nach Infusion von kalter Konservierungslösung vor der kalten Lagerung gemacht wurden, hatten eine gleichartige ICAM-1 Expression wie in normalen Lebern.

Nach der kalten Lagerung zeigten 16 der 30 Biopsien (53,3%) eine Induktion von ICAM-1 auf Hepatozyten und sinusoidalen Endothelzellen. Die restlichen 14 Biopsien (46,7%) waren ähnlich wie die normalen Kontrollen.

Nach der Reperfusion hatten 27 von 37 Biopsien (73%) einen Anstieg der ICAM-1 Färbung auf Hepatozyten, sinusoidalen und vaskulären Endothelzellen im Vergleich zu den normalen Kontrollen.

Die kalte Ischämiezeit wurde definiert vom Zeitpunkt des Abklemmens der Aorta im Donor bis zur portalen Reperfusion im Empfänger.

Es zeigte sich keine Korrelation zwischen der kalten Ischämiezeit und der ICAM-1 Expression nach der kalten Lagerung oder nach der Reperfusion.

In dieser Arbeit von Bhargava A et al. war somit die ICAM-1 Expression nach kalter Lagerung nur in etwas mehr als der Hälfte der Biopsien erhöht. Dies widerspricht den Ergebnissen in der hier vorliegenden Arbeit, die einen signifikanten Abfall der ICAM-1 Expression nach normothermer Hypoxie

aufweisen im Vergleich zur Kontrolle. Nach Reperfusion beobachtete die Arbeitsgruppe um Bhargava A. einen Anstieg der ICAM-1 Expression auf 27 Biopsien (73%). In den vorliegenden Versuchen lag bei Reperfusion die ICAM-1 Expression des hypoxischen Ansatzes etwa im gleichen Bereich wie die Kontrolle.

Dieser Vergleich kann nur unter dem Gewahrwerden von Speziesdifferenzen durchgeführt werden. Des weiteren werden in der Studie von Bhargava A et al. alle klinisch relevanten Einflussfaktoren automatisch miteinbezogen (chirurgische Effekte, Ischämie, Reperfusion, Zytokine,...), wohingegen diese Arbeit hier die in der Zellkultur v.a. durch Hypoxie und Reperfusion entstandenen Effekte beschreibt.

4.2.5. Schlussfolgerungen

Der Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit denen aus den Studien der vorhandenen Literatur, insbesondere der direkt mögliche Vergleich mit der Arbeit von Schenk, M. (1999), lässt den Schluss zu, dass bei der „in vitro“-Untersuchung von Endothelzellen die Art der Hypoxie (normotherm–hypotherm) die entscheidende Rolle spielt. Bei der normothermen Hypoxie kommt es zu einer deutlichen Dichtereduktion des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 während der Ischämiezeit, danach folgt eine Hochregulation der ICAM-1 Dichte. Im weiteren Verlauf überschreitet die ICAM-1 Dichte der Hypoxie allerdings nur einmal marginal das Niveau der Kontrolle. Wenn sich diese Ergebnisse so auf den Menschen übertragen ließen, würde das einen herausragenden Vorteil für die normotherme Form der Hypoxie darstellen. Allerdings scheint es sinnvoll und angebracht diesen Versuchsansatz erneut zu verifizieren und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu untersuchen.

Die Studie der Arbeitsgruppe von Kojima N (2001) spiegelt vor allem auch die Bedeutung anderer Faktoren wie Mikrozirkulationsstörungen oder Zytokine wieder. Diese Faktoren scheinen allerdings „in vivo“ deutlich schwieriger

beeinflussbar zu sein. Dennoch muss für eine optimale Organfunktion und Organüberlebenszeit an vielen Punkten eine Verbesserung versucht werden.

5. Zusammenfassung

Die Transplantatabstoßung ist ein multifaktorielles Geschehen. Im Vordergrund stehen dabei die immunologisch bedingten Pathomechanismen. Aufgrund von Biopsien im Stadium der Abstoßung wurde den Leukozyten eine Schlüsselrolle zugeteilt. Seit einigen Jahren ist die gerichtete Wanderung der Leukozyten aus der Blutbahn in das Gewebe (z.B. bei Entzündung, Autoimmunerkrankungen oder Transplantatreaktionen) näher bekannt, welche in Form einer Kaskade abläuft. Die Adhäsionsmoleküle, wie zum Beispiel ICAM-1, spielen dabei eine essentielle Rolle. Sie unterliegen einem sehr kompliziertem Regulationssystem (Expressionsstatus, Induzierbarkeit, Aktivierbarkeit,...), was diese Kaskade zu einem hoch spezifischen Vorgang werden lässt.

Aufgabe dieser Arbeit war es den Einfuß von Hypoxie und Reoxigenierung, unabhängig von weiteren Modulatoren (z.B. Zytokinen), auf die ICAM-1 Expression auf Leberendothelzellen von Ratten zu untersuchen.

Dabei konnte gezeigt werden, dass, genormt auf die Zelldichte, unter normothermen hypoxischen Bedingungen die ICAM-1 Expression auf den Zellen deutlich abfällt und anschließend unter Reoxigenierung eine reaktive Hochregulation erfährt, allerdings etwa in den Bereich der Kontrolle.

In der Literatur sind kaum vergleichbare Arbeiten durchgeführt worden, dennoch zeigt die Arbeit von Schenk M (1999) ein konträres Ergebnis, wobei die verschiedenen Hypoxieformen (hypotherme versus normotherme Hypoxie) schon die Differenz bedingen könnte.

Sämtliche Vergleiche mit Ergebnissen (Leberbiopsien) aus Rattentransplantationsversuchen oder aus klinischen Studien bei humaner Lebertransplantation sind nur eingeschränkt möglich, da es sich hierbei um „in vivo“-Situationen handelt. Die „in vivo“-Studien spiegeln die Situation einer Maßnahme unter einer Vielzahl von Einflussfaktoren (Hypoxie, Reoxigenierung, Zytokine, Chemokine, Zellwechselwirkungen,...) wider, wohingegen die „in vitro“-Studie definierte Einflussfaktoren untersuchen möchte, um den zugrundeliegenden Pathomechanismus aufzudecken. Zusätzlich spielt in einigen Fällen die Speziesdifferenz eine wichtige Rolle.

In weiteren Zellkulturversuchen gilt es die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen im Vergleich zur vorhandenen Literatur, mit deutlicher Überlegenheit der normothermen Hypoxie, weiter zu konsolidieren. Daraus könnten sich dann bei Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus gegebenenfalls neue therapeutische Ansätze entwickeln.

6. Literaturverzeichnis

1. **Adams DH, Shaw S (1994)**
   Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration
   Lancet, 343, 831-836

2. **Albelda SM, Buck CA (1990)**
   Integrins and other cell adhesion molecules
   FASEB J, 4, 2868-2880

3. **Bhargava A, Bradley NJ, Burroughs AK, Dhillon AP, Rolles K, Davidson BR (1995)**
   Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 and CD 4/CD 8 Lymphozyte Markers in Perioperative Liver Allograft Biopsies
   Transplant Proc, 27, 2814-2815

4. **Carlos TM, Harlan JM (1994)**
   Leucocyte-Endothelial Adhesion Molecules
   Blood, 84, No 7, 2068-2101

5. **Dallman MJ (2001)**
   Immunobiology of graft rejection, 1-28
   in:Thiru S, Waldmann H
   Blackwell Science Ltd, 2001

6. **Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA (1991)**
   Binding of the integrin Mac-1 (CD 11b/CD 18) to the third immunoglobulin-like of ICAM-1 (CD 54) and its regulation by glycosylation
   Cell, 65, 961-971

7. **Dustin ML, Rothlein R , Bhan AK, Dinarello CA (1986)**
   Induction by IL 1 and interferon-γ: tissue distribution, biochemistry and function of a natural adherence molecule (ICAM-1)
   J Immunol, 137, 245-254

8. **El-Wahsh M, Fuller B, Davidson B, Rolles K (2003)**
   Hepatic cold hypoxia and oxidative stress: implications for ICAM-1 expression and modulation by glutathione during experimental isolated liver preservation
   Cryobiology, 47, 165-173

9. **Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA (2000)**
   Major Histokompatibility Complex, 173-199
   in: Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA
   Kuby Immunology
   Fourth edition, W.H. Freeman and Company, New York, 2000

10. **Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA (2000)**
Transplantation Immunology, 517-537
in: Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA
Kuby Immunology
Fourth edition, W.H. Freeman and Company, New York, 2000

11. **Gütgemann A, Schriefers KH, Esser G, Lee TS, Paquet KJ, Kaufer C (1969)**
Erfahrungsbericht über eine homologe Lebertransplantation
[Report of experience with homologous liver transplantation]
Dtsch Med Wochenschr, 94, 1713-1717

12. **Hibbs ML, Xu H, Stacker SA, Springer TA (1991)**
Regulation of adhesion to ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin β subunit
Science, 251, 1611-1613

13. **Jaeschke H (1997)**
Cellular adhesion molecules: regulation and functional significance in the pathogenesis of liver diseases
Am J Physiol, 273, G602- G611

14. **Janeway CA, Travers P (1995)**
Die CD-Antigene (Anhang I), 589-596
in: Immunologie
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin-Oxford

15. **Knook DL, Sleyster ECH (1976)**
Separation of Kupffer and endothelial cells of the rat liver by centrifugal elutriation
Exp Cell Res, 99, 444-449

16. **Kojima N, Sato M, Suzuki A, Sato T, Satoh S, Kato T, Senoo H (2001)**
Enhanced Expression of B7-1, B7-2, and Intercellular Adhesion Molecule 1 in Sinusoidal Endothelial Cells by Warm Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Liver
Hepatology, 34, 751-757

17. **Lasky LA (1992)**
Selectins :interpreters of cell-specific carbohydrates information during inflammation
Science, 258, 964-969

18. **Monaco JJ (1995)**
Pathways for the processing and presentation of antigens to T cells.
J Leukoc Biol,57, 543-547

19. **Moore FD, Smith LL, Burnap TK, Dallenbach FD, Dammin GJ, Gruber UF, Shoemaker WC, Steenburg RW, Ball MR, Belko JS (1959)**
One-stage homotransplantation of the liver following total hepatectomy in dogs.
Transplant Bull, 6, 103-107

20. **Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM (1993)**
PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes
J Exp Med, 178, 449-460

21. **Ohira H, Ueno T, Shakado S, Sakamoto M, Torimura T, Inuzuka S, Sata M, Tanikawa K (1994)**
Cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells express intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) by tumor necrosis factor-α or interleukin-1α stimulation
J Hepatol, 20, 729-734

22. **Schenk M (1999)**
Expression immunologisch relevanter Oberflächenmoleküle bei der Lebertransplantation, 1-141
Dissertationsschrift der Fakultät Allgemeine und Angewandte Naturwissenschaften
Universität Hohenheim

23. **Schürmann G (1997)**
Zelladhäsion. Molekulare Grundlagen und erste Aspekte für die Chirurgie
Chirurg, 68, 477-487

24. **Schwartz RH (1990)**
A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy
Science, 248, 1349-1356

25. **Shah V, Friedman AL, Navarro VJ (1997)**
Immunology of liver transplantation: clinical management aspects
Gastroenterologist , 5, 137-147

26. **Staunton DE, Dustin ML, Erickson HP, Springer TA (1990)**
The arrangement of the immunglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus
Cell, 61, 243-254

27. **Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML (1988)**
Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunglobulin and integrin supergene families
Cell, 52, 925-933

28. Van de Stolpe A, van der Saag PT (1996)
Intercellular adhesion molecule-1
J Mol Med, 74, 13-33

29. Wight D (2001)
Liver Transplantation, 262-299
in: Thiru S, Waldmann H
Pathology and Immunology of Transplantation and Rejection
Blackwell Science Ltd, 2001

7. Abkürzungsverzeichnis

ADCC	=	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
APC	=	antigen- presenting cell
CD	=	cluster of differentiation
CTL	=	cytotoxic T lymphocytes
DNase	=	Desoxiribonuklease
FACS	=	fluorescence activated cell sorter
FCS	=	fetal calf serum
FITC-Konjugat	=	fluorescein isothiocynate Konjugat
HLA	=	human leucocyte antigen
ICAM-1	=	intercellular adhesion molecule 1
ICAM-2	=	intercellular adhesion molecule 2
IFN-γ	=	Interferon γ
IL-2	=	Interleukin 2
IL-4	=	Interleukin 4
IL-5	=	Interleukin 5
IL-6	=	Interleukin 6
IL-8	=	Interleukin 8
LFA-1	=	lymphocyte function-associated antigen 1
LFA-3	=	lymphocyte function-associated antigen 3
Mac-1	=	Eigenname des Moleküls
MHC	=	major histocompatibility complex
MIP-1β	=	macrophage inflammatory protein 1β
PAF	=	platelet activating factor
PBS	=	Phosphatgepufferte Saline
PECAM-1	=	platelet-endothelial cell adhesion molecule 1
T_c-cells	=	T cytotoxic cells
TCR	=	T-cell receptor
T_{DTH} cell	=	T cell delayed-type hypersensitivity
T_H-Zellen	=	T- Helferzellen
TNF-α	=	Tumor-Nekrose-Faktor α

TNF-β	=	Tumor-Nekrose-Faktor β
VCAM-1	=	vascular cell adhesion molecule 1
VLA-4	=	very late antigen 4

Danksagung

Das Zusammenwirken vieler führte zum Entstehen dieser Arbeit. Deshalb möchte ich danken:

Herrn Prof. Dr. med. R. Viebahn danke ich für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas sowie für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe mitzuwirken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. M. Schenk für seine ausgezeichnete Betreuung und Zusammenarbeit während dieser Arbeit. Für meine vielen Fragen hatte er stets Zeit und ein offenes Ohr. Seine freundliche und ausgezeichnete Unterstützung haben großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Dem gesamten Team des Leberzellkulturlabors gilt mein herzlicher Dank für ihr Fachwissen und ihre Freundlichkeit, mit denen sie mir bei der Laborarbeit stets zur Seite standen.
Ganz besonders danken möchte ich auch Frau Birgit Metzdorf, auf deren reiche Erfahrung im Umgang mit Zellen und Zellkulturen ich zurückgreifen durfte.

Ich danke Lampros Kampouridis für seine freundschaftlichen Ermutigungen.

Liebevolle Unterstützung während dieser Arbeit habe ich durch meinen Mann, Marcus Benz, erfahren.

Lebenslauf:

Persönliche Daten:

Name:	Benz, geb.Grüninger
Vornamen:	Birgit Dorothe
Geburtsdatum:	06.04.1973
Geburtsort:	Tübingen

Schulbildung:

1979 –1983	Grundschule in Bondorf
1983 – 1992	Schickhardt-Gymnasium in Herrenberg
19. Mai 1992	Abitur

1992 – 1993	Freiwilliges Soziales Jahr, Universitätsklinikum Tübingen

Studium:

1993 – 1995	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
09/ 1995	Ärztliche Vorprüfung
1995 – 2001	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
03/ 1997	Erstes Staatsexamen
03/ 2000	Zweites Staatsexamen
18.05.2001	Drittes Staatsexamen

Facharztweiterbildung:

07/ 2001 – 03/ 2002	ÄiP, Pädiatrie, Klinik Hochried, Murnau am Staffelsee
04/ 2002 – 12/ 2002	ÄiP, Pädiatrie, Klinikum Memmingen
01/ 2003 – 03/ 2003	Assistenzärztin, Pädiatrie, Klinikum Memmingen
04/ 2003 – 05/ 2005	Assistenzärztin, Pädiatrie, Kliniken St. Elisabeth, Neuburg a. D.
seit 05/ 2005	Assistenzärztin, Pädiatrie, Klinikum Dritter Orden, München