Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral-,
und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Induktion und Regulation der Hämoxygenase-1 in humanen Hepatozyten

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Eda Müller, geb. Tüzüner
aus Denizli, Türkei

Dekan: Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. PD Dr. Andreas Nüssler

2. Univ. Prof. Dr. Friedrich C. Luft

3. Prof. Dr. Dr. M. G. Bachem

Datum der Promotion: 20. Sept. 2002

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift

“Induktion und Regulation der Hämoxygenase-1 in humanen Hepatozyten ”

selbständig angefertigt habe, die Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer oder eigener Arbeiten darstellt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden. Ich habe und hatte bisher kein Promotionsverfahren an anderen Stellen beantragt.

Berlin, den 28. September 2002

Zusammenfassung

Der nach Leberoperation und -transplantation auftretende Ischämie-/ Reperfusionsschaden (I/R) und die konsekutive Inflammation des Lebergewebes stellen ein bedeutendes klinisches Problem dar. In der vorliegenden Arbeit wurden Einflüsse der warmen und kalten Ischämie (100% N_2 bei 37°C bzw. 4°C) sowie der Exposition inflammatorischer Zytokine und Endotoxin (IL-1β, 10 U/ml; IFN-γ, 100 U/ml; TNF-α, 500 U/ml; LPS, 5 µg/ml) auf die Expression der Hämoxygenase-1 (HO-1) mRNA und seines Proteins, einem Vertreter der Hitze-Schock-Proteine mit potentiell antioxidativer Wirkung, in humanen Hepatozytenprimärkulturen untersucht. Warme und kalte Ischämie stimulierten die HO-1 mRNA Expression in humanen Hepatozyten nach 0,5 bis 1h. Das HO-1 Protein wurde über 0,5-6h maximal exprimiert. Der Zellschaden, gemessen an der AST und LDH Freisetzung unter ischämischen Bedingungen wurde insbesondere nach 24 h beobachtet. Nach Zytokinexposition wurde die höchste Expressionsrate der mRNA durch IFN-γ hervorgerufen, gefolgt von TNF-α, LPS und IL-1β. Jedes einzelne Zytokin stimulierte die HO-1 mRNA Expression nach 0,5 h, erreichte ein Maximum nach 3 h und fiel nach 6 h ab. Nach Stimulation mit einem Zytokinmix (CM; IFN-γ, TNF-α, IL-1β, LPS) trat ein Maximum der HO-1 mRNA Expression erst nach 6 h ein, wobei ein signifikanter Zellschaden nach 12 h beobachtet wurde. Die HO-1 mRNA und Proteinexpression war nach Exposition von 6 h des Sauerstoffperoxides (H_2O_2, 200-1000 µM) erhöht. Die HO-1 mRNA und Proteinexpression war nach S-nitrosoacetylpenicillamin (0.5 mM) Exposition, einem NO Donator, für 3-12 h verstärkt. Nach Cobalt-protoporphyrin (CoPP, 1µM) Exposition, einem potenten HO-1 Induktor, wurde eine erhöhte mRNA- und Proteinexpression beobachtet. Dass CoPP die HO-1 mRNA- und Proteinneusynthese induziert, konnte durch die selektive Blockade mit Actinomycin D und Cycloheximide bewiesen werden. Die Neusynthese konnte ebenfalls unter warmer und kalter Ischämie gezeigt werden. Hemin (10 µM), ein weiterer Induktor der HO-1, induzierte die HO-1 mRNA nach 3 h und das Protein nach 6 h. Die HO-1 Enzymaktivität wurde mittels Bilirubinbildung und Messung des Fe^{2+} Gehalts der Zellen bestimmt. Bei der Bilirubinbildung wurde die höchste Aktivität nach warmer Ischämie gemessen, gefolgt von kalter Ischämie, CM und der Kontrollgruppe. Die intrazelluläre Fe^{2+} Messung ergab ebenfalls die höchste Enzymaktivität nach warmer Ischämie. Die Vorbehandlung humaner Hepatozyten mit CoPP (1-50 µM) für 8 h, schützte die Zellen teilweise

vor einer warmen und kalten Ischämie. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die pharmakologische Induktion der HO-1 somit bei großen allgemeinchirurgischen Eingriffen, wie der Leberteilresektion oder der Transplantation, einen protektiven Effekt entfalten könnte.

Schlagwörter: Hämoxygenase 1, Inflammation, Ischämie, humane Hepatozyten, Leberresektion, Lebertransplantation

Induction and Regulation of Heme Oxygenase-1 in Human Hepatocytes

Hepatic injury induced by ischemia/ reperfusion (I/R) and inflammation following surgeries or transplantations creates important clinical problems. In this study, the effect of inflammatory conditions such as cytokine/ endotoxin exposure (IL-1β, IFN-γ, TNF-α, LPS), warm and cold ischemia on HO-1 mRNA and protein, a member of heat shock proteins, was investigated. It was observed that IFN-γ caused the highest HO-1 mRNA expression, followed by TNF-α, LPS and IL-1β. Each stimuli increased HO-1 mRNA expression after 0.5 h, peaked at 3 h and decreased after 6 h. Highest HO-1 protein expression was observed after 0.5 to 1 h of stimulation with IFN-γ, which was followed by LPS, TNF-α and IL-1β. The peak of HO-1 expression using all four stimuli (CM) was after 6 h. CM caused a significant increase in LDH and AST after 12 h. Warm and cold ischemia stimulated HO-1 mRNA expression in human hepatocytes at 0.5-1 h. HO-1 protein expression had its maximum between 0.5-6 h. Cellular damage measured as the release of LDH and AST was significant after 24 h. Mimicking oxydative stress, hepatocytes were exposed to 200-1000 μM H_2O_2 for 6 h which also showed an increased HO-1 mRNA and protein expression. HO-1 mRNA and protein expression revealed an increase after SNAP exposure at 3-12 h. Results with CoPP (10 μM), a potent inducer of HO-1, displayed an increase in HO-1 mRNA and protein expression. It was proved, that CoPP induced new synthesis of mRNA and protein by its blocking agents such as actinomycin D and cycloheximide, respectively. Hemin (10 μM), another inducer of HO-1, triggered HO-1 mRNA expression after 3 h and protein expression after 6 h. The HO-1 enzyme activity was measured by bilirubin production after exposure to CM, as well as warm and cold ischemia. The highest enzyme activity was found after warm ischemia, followed by cold ischemia, CM and then by the control group. Fe^{2+} content of the cells, used as another method to judge HO-1 activity, confirmed our findings. Pre-treatment of human hepatocytes with different concentrations of CoPP (1-50 μM) protect cells against warm or cold ischemia. Therefore, we conclude that pharmacological induction of HO-1 may have therapeutic potential under inflammatory conditions such as seen during liver resection or liver transplantation.

Keywords: Heme oxygenase 1, inflammation, ischemia, human hepatocytes, liver resection, liver transplantation

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 9

1.1 ISCHÄMIE: ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE 9
1.2 SEPSIS 9
1.3 ZYTOKINE UND ENDOTOXIN 10
1.4 SIGNALTRANSDUKTION 10
1.5 OXIDATIVE UND ANTIOXIDATIVE MECHANISMEN 11
1.6 HÄMOXYGENASEN (HO) 12

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT 16

3 MATERIAL UND METHODEN 17

3.1 VERWENDUNG HUMANEN GEWEBES 17
3.2 ISOLATION DER HUMANEN HEPATOZYTEN 17
3.3 ELEKTROPHORESE UND WESTERN BLOT 22
3.4 ISOLATION DER RNA, REVERSE TRANSKRIPTION UND POLYMERASEKETTEN-REAKTION 28
3.5 LACTAT-DEHYDROGENASE (LDH) UND ASPARTAT AMINOTRANSFERASE (AST) BESTIMMUNG: 34
3.6 HO-1 AKTIVITÄT 35
3.7 EXPERIMENTENÜBERSICHT: 39
3.8 STATISTISCHE ANALYSE 43

4 ERGEBNISSE 45

4.1 EINFLUß VON ZYTOKINEN UND ENDOTOXIN AUF DIE EXPRESSION DER HO-1 MRNA, DES HO-1 PROTEINS UND AUF DIE ZELLULÄRE SCHÄDIGUNG 45
4.1 EINFLUß DER WARMEN ISCHÄMIE AUF DIE EXPRESSION DER HO-1 MRNA UND PROTEINEXPRESSION SOWIE DEREN EFFEKTE AUF DIE ZELLULÄRE SCHÄDIGUNG 49
4.2 EINFLUß DER KALTEN ISCHÄMIE AUF DIE EXPRESSION DER HO-1 MRNA UND PROTEINEXPRESSION SOWIE DEREN EFFEKTE AUF DIE ZELLULÄRE SCHÄDIGUNG 49
4.3 DE NOVO SYNTHESE DER HO-1 MRNA UND DES PROTEINS BEI WARMER UND KALTER ISCHÄMIE 52
4.4 ANSTIEG DER HO-1 AKTIVITÄT WÄHREND EINER ENTZÜNDUNGSREAKTION SOWIE UNTER WARMER UND KALTER ISCHÄMIE 52

4.5 DER EINFLUß VON H_2O_2 AUF DIE EXPRESSION DER HO-1 MRNA, DES HO-1 PROTEINS SOWIE AUF DIE ZELLULÄRE SCHÄDIGUNG 55
4.6 DER EINFLUß VON SNAP AUF DIE EXPRESSION DER HO-1 MRNA UND DES HO-1 PROTEINS SOWIE AUF DIE ZELLULÄRE SCHÄDIGUNG 56
4.7 DER PHARMAKOLOGISCHER EINFLUß VON COPP UND HEMIN AUF DIE EXPRESSION DER HO-1 MRNA, DES HO-1 PROTEINS UND AUF DIE ZELLULÄRE SCHÄDIGUNG 57
4.8 PHARMAKOLOGISCHE PRÄSTIMULATION DER HO-1 ZUR PROTEKTION DES ISCHÄMISCHEN ZELLSCHADENS..... 60
4.9 HO-1 AKTIVITÄT UNTER INFLAMMATORISCHEN UND ISCHÄMISCHEN BEDINGUNGEN 62

5 DISKUSSION..... 63

5.1 ENTZÜNDUNGSMODELLE 63
5.2 MODELLE DER WARMEN UND KALTEN ISCHÄMIE 64
5.3 WIRKUNG VON S- NITROSOACETYLPENICILLAMIN (SNAP) ALS NO-DERIVAT UND H_2O_2 ALS REAKTIVER SAUERSTOFFMETABOLIT 66
5.4 PHARMAKOLOGISCHE INDUKTION DER HO-1 67
5.5 DER EINFLUß DER VORBEHANDLUNG VON HO-1 INDUKTOREN AUF DIE ISCHÄMISCHE ZELLSCHÄDIGUNG 68
5.6 HO-1 AKTIVITÄT UNTER INFLAMMATORISCHEN BEDINGUNGEN..... 69
5.7 ZUSAMMENFASSENDE BEWERTUNG 69

LITERATURVERZEICHNIS..... 70

DANKSAGUNG..... 85

LEBENSLAUF..... 86

1 Einleitung

1.1 Ischämie: Ätiologie und Pathogenese

In der Transplantationsmedizin führt der Ischämie-/ Reperfusionsschaden häufig zu einer frühen Funktionsbeeinträchtigung oder sogar zu primären Versagen des Transplantates. Bei Leberresektionen kann es in Folge einer Ischämie/ Reperfusion (I/R) zu einer Enzündung mit transienter oder permanenter Zellschädigung kommen [24, 32]. Die Erfolgsaussichten von Leberresektionen und Transplantationen haben sich durch Fortschritte in der Operationstechnik, der Organkonservierung und durch die Entwicklung neuer immunsuppressiver Therapeutika verbessert. Dennoch stellt die Ischämie in der Chirurgie der Leber weiterhin ein wichtiges klinisches Problem dar [24]. Die I/R wurde in vielen Studien sowohl unter den Bedingungen der warmen Ischämie, wie sie bei Leberresektionen auftritt, als auch unter der kalten Ischämie, wie bei orthotopen Lebertransplantationen, untersucht [80]. Eine Ischämie von mehr als 12 h führt bei der Lebertransplantation durch zentrolobuläre Nekrosen zu primären Organversagen und ist mit einer erhöhten Inzidenz einer akuten und chronischen Transplantatabstoßungsreaktion verbunden [5]. Dabei werden verschiedene Formen der Zellschädigung beobachtet [54]. Bei der kalten Ischämie wurde eine protrahierte ATP Depletion [50, 68], gesteigerte Glykolyse [21, 68] und Kupffer-Zellaktivierung [80] und bei der warmen Ischämie eine Schädigung der Mitochondrien [12] beschrieben. Es hat sich gezeigt, daß sinusoidale Endothelzellen empfindlicher auf die kalte Ischämie reagieren, während die warme Ischämie primär Hepatozyten schädigt [94, 95].

1.2 Sepsis

Der septische Schock ist eine gefürchtete Komplikation mit häufig letalem Ausgang. Er ist charakterisiert durch Hypotension, vaskuläre Hyporeaktivität durch die Freisetzungen vasoaktiver Substanzen, myokardiale Dysfunktion und Störung der Mikrozirkulation [100, 105]. Endotoxin, ein Kapselbestandteil gram negativer Bakterien, wurde hauptverantwortlich für die septischen Komplikationen gemacht [68, 85]. In den letzten Jahren hat es sich jedoch etabliert, dass auch gram positive Bakterien zu einer Sepsis führen können [113]. In der akuten Phase Reaktion, w.z.B. bei systemischer Entzündungsreaktion nach Gewebeschädigung wie Trauma und Infektionen, werden in der Leber spezifische Proteine

synthetisiert [97]. Die Leber gehört zu den entscheidenden Organen in der septischen Abwehrreaktion, da sie die meisten Makrophagen des Körpers (Kupffer Zellen) enthält [97]. Die Zytokine, wie Interleukin-1β (IL-1β) und Tumor Nekrose Faktor-α (TNF-α) gehören zu den bedeutendsten Mediatoren dieser Reaktion und werden von den Kupffer Zellen freigesetzt [96]. Ein Ausfall der Leberfunktion kann somit den Verlauf septischer Komplikationen dramatisch protrahieren.

1.3 Zytokine und Endotoxin

Die hepatische Schädigung bei der Ischämie oder Sepsis kann eine komplexe Kaskade inflammatorischer Mediatoren auslösen. Dabei haben Zytokine eine wichtige Rolle in der körpereigenen Abwehrreaktion. IFN-γ z.B. wird in Hepatozyten bei viralen und parasitären Infektionen synthetisiert und kontrolliert deren Proliferation [97]. Die Freisetzung von TNF-α aus den Makrophagen wird durch lebende oder tote gram negative Bakterien, Candida und durch Parasiten initiert [25, 88]. IL-1β hat dabei eine regulatorische Funktion auf Wachstum und Differenzierung von B-Lymphozyten [97]. Inflammatorische Zytokine und Endotoxin können nach exzessiver Freisetzung auch zu deletären Effekten führen. Die Aktivierung der Kupffer Zellen führt zu einer Überproduktion und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, einschließlich TNF-α und IL-1β [23, 25, 63]. Diese Zytokine induzieren die inflammatorische Antwort, einschließlich der Synthese Akuter Phase Proteine, verstärken die intra- und interzelluläre Permeabilität und steigern die Adhäsionsfähigkeit der neutrophilen Granulozyten an den Sinusoiden [68]. TNF-α triggert außerdem den programmierten Zelltod, die Apoptose [68]. Während des septischen Schocks bewirkt LPS die TNF-α Freisetzung aus Makrophagen. Dadurch kann eine Hypotension, durch eine NO/ CO vermittelte cGMP Stimulation, ausgelöst sowie eine dissemenierte intravasale Koagulation und ein multiples Organversagen hervorgerufen werden [88].

1.4 Signaltransduktion

Es hat sich gezeigt, daß während der I/R reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet werden und diese potentiell zwei Signaltransduktionswege über NF-κB und AP-1 regulieren können [124]. ROS sind an der unmittelbaren Reaktion der I/R Schädigung beteiligt [32, 63, 124] und haben eine große Bedeutung in der akuten Zellantwort auf die einsetzende Gewebeschädigung und die

Entzündungsreaktion [28, 124]. Die Konzentration und Typ der AP-1 Proteine sowie deren posttranslationaler Modifikationen können die Aktivität der DNA-Bindung und Aktivierung verschiedener Gene verändern [124]. AP-1 wird durch die Anwesenheit von Endotoxin [16], Hyperoxie und freie Sauerstoffradikale [124] induziert. NF-κB kann durch verschiedene Einflüsse, w.z.B. Zytokine (IL-1β, TNF-α), Endotoxin (LPS), Aktivatoren der Proteinkinase C, durch Viren und Oxidanzien stimulert werden [9, 124]. Im Rahmen der Zellaktivierung werden die IκB Proteine phosphoryliert und dissoziieren vom NF-κB, so daß der freie NF-κB Komplex in den Nukleus gelangt, an die DNA bindet und die Transkription der entsprechenden Gene initiiert [61].

1.5 Oxidative und antioxidative Mechanismen

Bei der Reperfusion des postischämischen Gewebes nach warmer und kalter Ischämie werden ROS generiert. ROS entstehen z. B. in der mitochondrialen Elektronentransportkette [7], unter Beteiligung der Cycloxygenase sowie zellulärer Enzyme, w.z.B. der Zytochrom P450 Oxidase, der Xanthinoxidase und der NADPH Oxidase [26, 32, 68]. Die Xanthinoxidase wird hauptsächlich für die Entstehung der ROS in postischämischen Geweben verantwortlich gemacht [78, 91]. Sie ist in Peroxysomen lokalisiert und in den Hepatozyten am höchsten konzentriert [6]. Sie generiert $O_2^{-\cdot}$ und H_2O_2 während des Metabolismus von Xanthin oder Hypoxanthin zu Harnsäure. Die Cyclo- und Lipoxygenase erzeugen ebenfalls $O_2^{-\cdot}$ und Singlet Sauerstoff bei der Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen. Andererseits führt die Fenton Reaktion zur Entstehung von Hydroxyl-Radikalen ($OH^{\cdot}$) [51]. ROS, einschließlich Superoxidradikale ($O_2^{-\cdot}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyradikale ($OH^{\cdot}$) können durch Lipidperoxidation, oxidative Modifikation von Proteinen und DNA zur Zellschädigung beitragen (siehe Abb. 1) [6, 51]. Zusätzlich schädigt die Akkumulation aktivierter neutrophiler Granulozyten im Leberparenchym das Gewebe durch Freisetzung von Oxidanzien und Proteasen [63]. Bei der Synthese der Oxidanzien in den Neutrophilen ist die NADPH Oxidase involviert. Neutrophile werden durch die Zytokin-induzierte Expression der Adhäsionsmoleküle von Endothelzellen und durch lebersynthetisierte Chemokine aktiviert [63]. Das aktive Enzym oxidiert NADPH wobei das freigesetzte Elektron molekularen Sauerstoff reduziert und $O_2^{-\cdot}$ bildet, welches weiter zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyradikalen ($OH^{\cdot}$) oder Hypochloridsäure (HOCl), also zu potenten

Oxidanzien reagiert [63]. Neben den oben erwähnten I/R und Entzündungsreaktionen, verursachen auch exogene Agenzien, w.z.B. Stickoxide und UV-Strahlung oxidativen Streß [49]. Daher spielt die Leber mit ihren antioxidativen Abwehrmechanismen eine bedeutende Rolle [47, 49]. Zu den antioxidativen, zellprotektiven Enzymsystemen gehören die Katalase, Glutathionperoxidase, Glutathionereduktase und Superoxiddismutase [49, 58]. Die Superoxiddismutase baut das diffusible Radikal $O_2^{-\cdot}$ zu H_2O_2 durch enzymatische Dismutation um. Glutathionperoxidase und Katalase hingegen bauen H_2O_2 zu Wasser ab. Es ist ferner bekannt, dass verschiedene Stressoren die Expression einer weiteren Gruppe von Proteinen, den sogenannten Hitze Schock Proteinen (HSPs) induzieren [55]. Ihre Expression wurde zuerst bei erhöhten Temperaturen nachgewiesen [55]. Hitze Schock ist jedoch nicht der einzige Stimulus für die Synthese von HSPs. Die Exposition von Zellen mit Aminosäurenanaloga, Schwermetallen, Proteinkinase C Stimulatoren, Ca^{2+}-Konzentration erhöhende Agenzien, Ischämie, mikrobielle Infektionen, NO, Hormone und Antibiotika können die Expression von HSPs induzieren [34, 55, 76, 77].

1.6 Hämoxygenasen (HO)

Bis heute sind drei Isoformen der HO identifiziert worden, die den Abbau von toxischem Häm im biologischen System koordinieren. Dazu gehören die durch oxidativen Stress induzierbare HO-1 aus der Familie der Hitze Schock Proteine [19], die konstitutive HO-2 [72] und die erst kürzlich identifizierte HO-3 [79]. Diese membrangebundenen Proteine sind Produkte unterschiedlicher Gene und sind in den Organen unterschiedlich verteilt [71, 72]. So wurde z.B. die höchste Konzentration an HO-1 in der Milz und der Leber gemessen, während HO-2 im Gehirn und im Testis am höchsten konzentriert ist [72]. Wie kein anderes Enzym, reagiert die HO-1 extrem empfindlich auf verschiedene Stresssoren, w.z.B. I/R, Hypoxie, Hyperoxie [110], inflammatorische Zytokine [5, 59, 96, 112], Endotoxin [5, 16, 92], Häm [111, 116], Metalle [43], Hypothermie, Hyperthermie [102] sowie die portale Hypertension [33] [Abb. 1]. Der HO-1 wird eine bedeutende Rolle in der Stressantwort zugeschrieben, da Sequenzen von NF-κB, AP-1 und AP-2 Bindungen in der Promotorregion des humanen HO-1 Gens gefunden wurden [16, 42, 61, 74, 101] [Abb. 1]. Die Unterschiedlichkeit der HO-1 Induktoren legt verschiedene Regulationslemente für dieses Gen nahe. Zwei weitere regulatorische Elemente, NF-κB und AP-2 werden als wichtige regulierende

Faktoren der Antwort der HO-1 auf oxidativen Stress, Zellschaden, Wachstum und Differenzierungsprozess angesehen [61]. Andere Proteine, die in der Enzündungsreaktion eine zentrale Rolle spielen, benutzen ebenfalls diese transkriptionellen Faktoren, NF-κB, AP-1 und HIF-1 w.z.B. NOS-2, welches eine bedeutende Rolle unter Stressbedingungen spielt [66, 117]. Es wird angenommen, dass HO-1 z.B. mit NOS-2 in der Stressantwort auf Hypoxie und Sepsis miteinander interagieren [10, 17, 72].

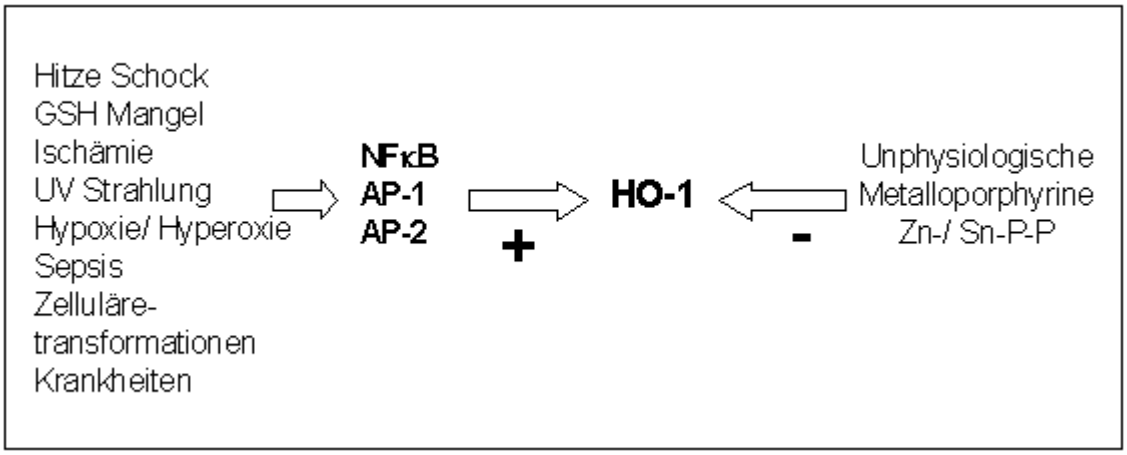


Abb. 1: Stimulatoren der HO-1

Häm, das Substrat der HO-1, ist ein Eisenkomplex aus Protoporphyrin IX [35]. HO-1 katalysiert die Oxidation des Häms durch α-*meso*-Hyroxylierung, Fragmentation des α-*meso*-Hydroxyhäms zu Verdohäm und seine Oxidation zu Biliverdin [67]. HO-1 verbraucht dabei drei Moleküle O_2 und fünf Elektronen, die von der Zytochrom P450 Reduktase für diese Reaktion zur Verfügung gestellt werden, um Häm in drei biologisch aktive Produkte, das Biliverdin, Eisen und Kohlenmonoxid abzubauen (CO) [14, 40, 67, 73] [Abb. 2]. CO spielt eine bedeutende Rolle in der neuronalen Signaltransduktion [123], in der Modulation des Gefäßtonus (Vasodilatation) [36, 39, 107, 114] und des Tonus glatter Muskelzellen [103] [Abb. 2]. CO (ein potentieller Signalüberträger wie das NO) reguliert das cGMP durch Bindung an der prostethischen Gruppe der Guanylatcyclase hoch und kann die Zellfunktion nach hämorrhagischer und oxidativer Zellschädigung modulieren [81]. Ferner ist gezeigt worden, dass CO die vasokonstriktiven Effekte des Hämoglobins und des Häms kompensieren kann [2].

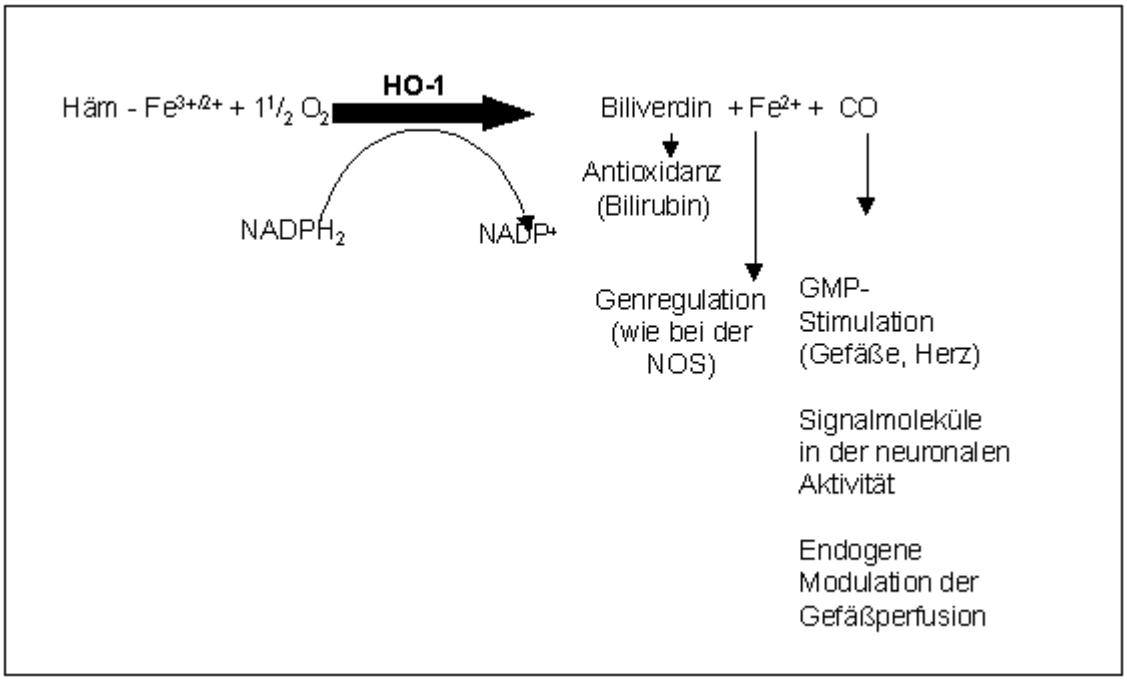


Abb. 2: Enzymreaktion der HO-1

In Fibroblasten konnte die Überexpression der HO-1 die TNF-α induzierte und durch CO mediierte Apoptose verhindern [99]. CO besitzt aber auch einen anti-inflammatorischen Effekt durch die mitogen-aktivierte Proteinkinase [89]. Dabei wird die LPS-induzierte Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF-α, IL-1β, supprimiert und IL-10 stimuliert [89]. Biliverdin wird durch die Biliverdinreduktase weiter zu Bilirubin, einem weiteren potenten Antioxidanz, Antimutagen und Anti-Komplementagenz abgebaut [38, 67]. Es wurde gezeigt, dass Bilirubin effizient die Lipidperoxidation hemmt und seine antioxidative Wirkung wahrscheinlich auf einer Interaktion mit dem antioxidativen α-Tocopherol und Lipoprotein beruht [2, 22]. Der Zusatz von Bilirubin zum Kulturmedium konnte ebenfalls die Reduktion der Zytotoxizität durch verschiedene Oxidanzien hervorheben [22]. Aus geschädigten Erythrozyten freigesetztes Hämoglobin ist ein Proxidanz und eine potentielle Quelle freier Radikale. So wurde gezeigt, dass in Endothelzellen inkorporiertes Häm die zytotoxische Wirkung granulozytär freigesetzter Oxidanzien durch Freisetzung seines Eisens und Bildung freier Sauerstoffradikale verstärkt [8]. Es kann außerdem als Promotor für die LDL-Oxidation dienen [8]. Andererseits kann Häm nach längerer Exposition einen Abwehrmechanismus gegenüber oxidativem Stress mittels Induktion der HO bewirken [56]. Die damit verbundene Eisenfreisetzung wird mit einem Anstieg der Ferritinsynthese begleitet. Ferritin, das eine potentiell antioxidative Wirkung

besitzt, bindet Eisen. Es wird daher vermutet, dass die Resistenz gegenüber oxidativen Stress zunehmen kann [8]. Es wurde ebenfalls an Fibroblasten gezeigt, dass die Zytoprotektion durch die HO-1 zusätzlich zur Zunahme des Eisenefflux, die intrazelluläre Eisenkonzentration moduliert und die Vitalität der Zellen reguliert [30]. Es hat sich gezeigt, dass die HO-1 eine protektive Rolle in den verschiedenen Geweben spielt [4, 72]. Wie dieses Protein aber in der humanen Leber funktioniert und reguliert wird, ist bislang unbekannt.

2 Zielsetzung der Arbeit

Es existieren viele Mechanismen der Zellschädigung, die während einer Leberoperation, Transplantation sowie der Sepsis von Bedeutung sind. Zahlreiche Studien haben die pathophysiologischen Mechanismen der oxidativen Zellschädigung untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass verschiedene Hitze Schock Proteine an zellprotektiven Mechanismen beteiligt sind. Wie oben bereits erwähnt, wurden die Funktions- und Regulationsmechanismen der Hämoxygenase, einem Mitglied aus der Familie der Hitze Schock Proteine, intensiv untersucht. Verschiedene Experimente an Tiermodellen und humanen Geweben wurde bislang durchgeführt, um die antioxidative Wirkung der HO-1 während des oxidativen Stress nachzuweisen. Bis dato liegen jedoch keine Untersuchungen zur Regulation der HO-1 an humanen Hepatozyten vor. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der:

- Charakterisierung der HO-1 auf dem Niveau der mRNA, des Proteins, der Messung der Aktivität in humanen Hepatozyten in der Zellkultur unter verschiedenen Stressbedingungen, w.z.B. warmer und kalter Ischämie, Exposition verschiedener Zytokine, Endotoxinexposition

- Quantifizierung der Zellschädigung durch Messung der LDH und AST Konzentrationen im Überstand der primären Leberzellkulturen.

- Untersuchung möglicher Mechanismen der Prästimulation dieses Gens, um Leberzellen vor den entsprechenden Schädigungsmustern zu schützen.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendung humanen Gewebes

Zur Gewinnung humaner Leberzellen wurde Lebergewebe aus reseziertem Gewebe von Patienten mit primären oder sekundären Lebertumoren verwendet. Die Verwendung des Gewebes für Forschungszwecke wurde von der zuständigen Ethikkommission für die speziellen Fragestellungen dieses Antrags genehmigt und geschah mit Einverständnis der Patienten. Lebergewebe von Patienten mit HIV, Hepatitis B oder C Infektionen wurde von den Untersuchungen ausgeschlossen.

3.2 Isolation der humanen Hepatozyten

Die Isolation humaner Hepatozyten erfolgte nach der von Dorko et al. beschriebenen in situ Kollagenase Perfusionstechnik [29].

3.2.1 Humanes Lebergewebe

Das humane Lebergewebe wurde aus Leberteilresektaten primärer und sekundärer Lebertumoren gewonnen. Unmittelbar nach der Resektion wurde unter sterilen Bedingungen, ein mittelgroßes Stück (ca. 6cm x 6cm x 4cm) vom Rand des makroskopisch normal erscheinenden Resektates entnommen. Das Gewebe wurde in einem Inkubationsmedium für Hepatozyten (siehe unten) gekühlt in das Labor transportiert.

3.2.2 Leberperfusionstechnik

Der erste Schritt der Leberperfusionstechnik beinhaltet die Entfernung des Blutes aus dem Gewebe und die Auftrennung der interzellulären Matrix, um eine Kultur isolierter Hepatozyten zu erhalten.

Reagenzien:

NaCl	#1.06404, Merck, Darmstadt, D
KCl	#4936, Merck, Darmstadt, D
CaCl $2H_2O$	#2382, Merck, Darmstadt, D
Hepes pKa 7,5	#H-3375, Sigma, Deisenhofen, D
Albumin, bovine (fettsäurenfrei) 0.5%	#A6003, Sigma, Deisenhofen, D
EGTA	#03780, Sigma, Deisenhofen, D
Kollagenase P	#1213873, Boehringer Mannheim, D

Trypan Blau Lösung - 0.5%	#L6323, Biochrom, Berlin, D
PBS Dulbecco's w/o $NaHCO_3$ 1x	#14200-059,LifeTech.,Karlsruhe, D
Rattenschwanz Kollagen	
pH-Meter	#CG84, Schott, Hofheim, D
Filter-0,2 µm	Falcon , Becton Dickinson, NJ, USA
Zellschaber Costar	Corning, NY, USA
Zentrifugenröhrchen, 50 ml	#420702, Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA

Perfusionsstammlösungen:

Perfusionslösung I (10 fach konzentriert) 1 Liter

NaCl	1,42 M
KCl	67 mM
Hepes pKa 7.5	100 mM

Es wurde in 1000 ml Aqua dest. gelöst, ein pH von 7,4 eingestellt, steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

Perfusionslösung II

a. Perfusionslösung II.1

Albumin	0,5%
KCl	6,7 mM
NaCl	67 mM
Hepes pKa 7.5	100 mM

Es wurde in 800 ml Aqua dest. gelöst und ein pH von 7,4 eingestellt.

b. Perfusionslösung II.2

$CaCl_2$ $2H_2O$	4,8 mM

$CaCl_2$ wurde in 100 ml Aqua dest. gelöst.
Perfusionslösung II.1 und II.2 wurden gemischt, auf einen Liter verdünnt, ein pH von 7,4 eingestellt, steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt. Diese Lösung wird im folgenden nur noch Perfusionslösung II (Per II) genannt.

Perfusionslösung:

Die Perfusionslösung wurde unmittelbar vor der Perfusion aus der Stammlösung hergestellt.

1. Perfusionslösung I (Per I) ohne EGTA für 500 ml

50 ml der Perfusionsstammlösung I wurden mit 450 ml Aqua dest. verdünnt und ein pH von 7,4 eingestellt. Diese Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt

2. Per I mit EGTA für 500 ml

50 ml der Perfusionsstammlösung I wurden mit 450 ml Aqua dest. verdünnt und mit 0,475 g EGTA, einem Calcium Komplexbildner, versetzt. Der pH Wert wurde auf 7,4 eingestellt, steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt

3. Per II mit Kollagenase für 100 ml

In 100 ml der Perfusionsstammlösung II wurden ca. 25 mg Kollagenase P gelöst, steril filtriert und in einem Wasserbad bei 37°C bis zur aktuellen Perfusion aufbewahrt.

Geräte für die Leberperfusion:

Wasserbad	Memnert, D
Buchner Sieb	Bender & Hohlbein, D
Silikonschläuche	Tygon, S-50 HL, D
Peristaltikpumpe	Roth, D
Laminarbox, Typ HS 18/2	Heraeus, D

Leberperfusion:

Die Flasche der Per I Lösung mit EGTA wurde in das Wasserbad bei 37°C gestellt. Das Silikonschlauchsystem wurde mit der Peristaltikpumpe verbunden und mit Per I gefüllt. Das Sieb wurde in einem Stativ über einer leeren, sterilen Flasche plaziert und das Lebergewebe eingesetzt. Danach wurde die Silikonschlauchspitze mit einem Lebergefäß verbunden und das Gewebe mit 150-200 ml der Per I perfundiert, um das verbliebene Blut auszuwaschen. Danach

wurde das Gewebe auf die gleiche Weise mit Per II plus Kollagenase perfundiert, wobei die aufgefangene Perfusionslösung über das andere Ende des Schlauchsystems zirkulierte. Die Leber wurde ungefähr 30 min perfundiert, bis eine weiche Gewebekonsistenz und damit die Lösung der interzellulären Verbindungen erreicht war.

Isolation der Hepatozyten

Instrumente und Geräte

Sterile Schere und Pinzette	
Trichter, Gaze	
Petrischale, 90 mm	#135131, Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA
Percoll-Lösung	#17-0891-01, Pharmacia Biotech AB, Uppsala Sweden
Phasenkontrastmikroskop CK2-TR	Olympus, Japan
Lichtmikroskop CHT	Olympus, Japan
Zentrifuge, Typ Labofuge 400R	Heraeus, D

Prozedur:

Nach der Perfusion wurde das Lebergewebe in eine Petrischale mit Per I ohne EGTA (4°C) gelegt und die Kapsel des Lebergewebes entfernt. Danach wurde die Zellsuspension über sterile Gaze in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen filtriert und mit 50 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in Per I ohne EGTA resuspendiert. Um die Hepatozyten von nichtparenchymatösen und toten Zellen zu trennen, wurde die Hepatozytensuspension mit 1:10 in 0,9% NaCl verdünnter Percoll Lösung auf eine Endkonzentration von 75% verdünnt und erneut mit 50 g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Pellet zweimal mit Per I ohne EGTA bei 50 g für 5 min bei 4°C gewaschen und am Ende im Hepatozytenkulturmedium resuspendiert. Eine Probe der Zellen wurden nach Färbung mit Trypan Blau in der Neubauer Kammer gezählt und ihre Vitalität bestimmt.

Trypan Blau Vitalfärbung:

Die Vitalität der Hepatozyten wurde mit dieser Färbung eingeschätzt [13]. Trypan Blau Lösung 0.5% wurde 1:4 mit PBS verdünnt. Davon wurden 900 µl mit 100 µl der Zellsuspension gemischt. Die Zellen wurden in vier Feldern der Neubauer Kammer gezählt und wie folgt berechnet:

$$Gesamtzellzahl = gezählteZellzahl \times 2500 \times 10(Dilutionsfaktor) \times ml(Medium)$$

Kulturmedium:

Williams' E Medium 500.00 ml	#32551-020, Life Technologies, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin 100 U/100 µg/ml	#15140-023, Life Technologies Karlsruhe, D
Insulin 1 µM	#I-5500, Sigma, Deisenhofen, D
Hydrocortison 1,4 µM	#H-4001, Sigma, Deisenhofen, D
Hepes Puffer 15 mM	#15630-056, Life Technologies, Karlsruhe, D
Kälber Serum 10 %	#B15-004, PAA, Linz, Österreich

3.2.3 Primäre Kultur der humanen Hepatozyten

Die Petrischalen wurden mit 12 Anteilen PBS und 1 Anteil Vitrogen (Kollagen) beschichtet und der Überstand nach 30 Minuten entfernt. Die isolierten Hepatozyten wurden auf die Kollagen beschichteten Petrischalen mit einer Zelldichte von 5 x 10^6 ausgesät [29]. Die Zellen wurden bei 37°C unter 95% Luft und 5% CO2 inkubiert, bis sie an der Kollagenschicht adherierten. Das Medium wurde täglich gewechselt.

3.3 Elektrophorese und Western Blot

3.3.1 Zytosol Isolation

Proteinlysate*:*

Reagenzien:

Protease Inhibitor-Lyse Puffer [70]:

TES	#T-0772, Sigma, Deisenhofen, D
DTT	#D-0623, Sigma, Deisenhofen, D

20 mM TES, 2mM DL-dithiothreitol und 10 % Glyzerol wurden mit Protease Inhibitoren gemischt.

Protease Inhibitoren:

Antipain (25 µg/ml)	#A-2671, Sigma, Deisenhofen, D
Aprotinin (25 µg/ml)	#10820, Fluka, Deisenhofen, D
Leupeptin (25 µg/ml)	#L2023, Sigma, Deisenhofen, D
Cymostatin (25 µg/ml)	#C-7268, Sigma, Deisenhofen, D
Phenanthroline (50 µM)	#131377, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Pepstatin (10 µg/ml)	#77170, Fluka, Deisenhofen, D
PMSF (100µM)	#P-7626Sigma, Deisenhofen, D

Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Petrischalen getrennt und zusammen mit dem Medium in ein Reagenzglas überführt und bei 4°C mit 1500 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen zweimal mit PBS resuspendiert und wie oben beschrieben, zentrifugiert, bis der Überstand klar war. PMSF (Phenylmethyl-Sulfonylfluorid) wurde mit dem Proteaseinhibitor-Lyse Puffer unmittelbar vor dem Gebrauch gemischt und das Pellet darin resuspendiert. Dann wurde die Probe in einem Eppendorf Röhrchen dreimal in flüssigen Stickstoff eingefroren und im Wasserbad wieder aufgetaut. Es ist darauf zu achten, dass die Proteinproben nicht zu warm werden, um die Denaturierung des Proteins zu vermeiden. Die Proben wurden dann bei -20°C aufbewahrt.

3.4 Messung der Proteinkonzentration

Reagenzien und Geräte:

Bovine Albumin	#A6003, Sigma, Deisenhofen, D
BCA Protein Assay Reagent A	#23223, Pierce, IL, USA
BCA Protein Assay Reagent B	#23223, Pierce, IL, USA
Fluostar Galaxy	BMG Labor Technologies, Offenburg, D

Der Proteingehalt der Proben wurde mit Hilfe der Lowry-Methode [60, 69] (Biuret-Reaktion) gemessen. Zur Erstellung einer Verdünnungsreihe wurde eine Proteinstandardlösung (Bovine Albumin) mit einer Konzentration von 2 mg/ml 1:2 mit Aqua dest. Verdünnt, um die höchste Standardkonzentration von 1 mg/ml zu erhalten. Danach wurde der Standardansatz schrittweise 1:2 bis auf eine Endkonzentration von 62,5 µg/ml verdünnt. Es wurden jeweils 20 µl in zwei Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Zur Messung der Proteinkonzentration der Proben wurden jeweils 20 µl in die Mikrotiterplatte pipettiert. BCA Protein Assay Reagenz A und B wurden 50:1 gemischt und jeweils 300 µl dieser Mischung zu jeder Probe sowie der Standardreihe pipettiert. Nachdem die Mikrotiterplatte 30 Minuten bei 37°C inkubiert wurde, erfolgte die Extinktionbestimmung bei einer Wellenlänge von 544 nm.

3.4.1 Elektrophorese und Western Blot

Es wurden die Expression von Hämoxygenase 1 und ß-Aktin in der Zellkultur humaner Hepatozyten im Western Blot analysiert. Die SDS Page und Western Blot Analyse erfolgte nach einem standardisierten Protokoll [104].

SDS Page und Western Blot:

Reagenzien*:*

Acrylamid Stammlösung 30% (Rotiphorese Gel 30)	#3029, Roth, Karlsruhe, D
Tris Puffer 0,5 M pH 6.8	#T1503, Sigma, Deisenhofen, D
Tris Puffer 1,5 M pH 8,8	#T1503, Sigma, Deisenhofen, D
SDS (sodium dodecyl sulfate)	#80-1128-74,Pharmacia,LKB,Upsala, Schweden

APS (ammonium peroxydisulfate)	#A-9164, Sigma, Deisenhofen, D
TEMED	#T-8133, Sigma, Deisenhofen, D
Bromphenol Blue	#B-6896, Sigma, Deisenhofen, D
Butanol	#59510, Merck, Darmstadt, D
Glycin	#G-7126, Sigma, Deisenhofen, D
Glyzerol	#G-7757, Sigma, Deisenhofen, D
Aminohexansäure	#800145, Merck, Darmstadt, D
Methanol	#1.06007, Merck, Darmstadt, D
2-Mercaptoethanol	#M-6250, Merck, Darmstadt, D
Na_2HPO_4	#6586, Merck, Darmstadt, D
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	#6345, Merck, Darmstadt, D
NaCl	#1.06404, Merck, Darmstadt, D
Tween-20	#27,4348, Sigma, Deisenhofen, D

Laemli Puffer:

Tris Puffer 0,5 M pH 6.8	25 ml
SDS 20%	10 ml
Glyzerol	10 ml
Bromphenol Blau 10%	50 µl

Trenngel:

In Abhängigkeit des Molekulargewichtes der zu analysierenden Proteine, wurden Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 12,5% [32 kDa (HO-1) und 42 kDa (ß-Actin)] verwendet.

	12,5%
Aqua dest.	3,4 ml
Acrylamid Stamm 30%	4 ml
Tris Puffer 1,5M pH 8,8	2,5 ml
SDS 10%	0,1 ml
APS	50 µl
TEMED	5 µl

Butanol wurde verwendet, um eine glatte Oberfläche des Gels zu erhalten.

Sammelgel:

Aqua dest	3,2 ml
Acrylamid Stamm 30%	0,5 ml
Tris Puffer 0,5 M pH 6,8	1,25 ml
SDS 10%	50 ml
APS	100 µl
TEMED	10 µl

Elektrophorese Puffer

(mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen)

Glycin	14,25 g
SDS 10%	1 g
Tris Puffer	3 g

Blot Puffer:

Katoden Puffer

Tris	25 mM
6-Aminohexansäure	40 mM
Methanol	20%

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

Anode-I Puffer

Tris	30 mM
Methanol	20%

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Anode-II Puffer

Tris	300 mM
Methanol	20%

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Waschpuffer

Die Stammlösung wurde auf 1:10 vor dem Gebrauch verdünnt.

PBS-Stammlösung (10x):

Na_2HPO_4	0,58 M
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0,17 M
NaCl	0,68 M

Roti-PVDF Transfer Membran	Roth, Karlsruhe, D
Gel Blotting Paper GB002	Merck, Darmstadt, D
femtoLUCENT Chemiluminescence Detection System	Chemicon, Hofheim/TS, D

Geräte:

Hitze Block: Blockthermostat BT 200	Kleinfeld, D
Gel- Elektrophoresekammer,Mini-Trans-blot	Bio-Rad, München, D
Semi-Dry-Blotter Pegasus	Phase, Lübeck, D
Spanungsquelle: Bio Rad Power Pac 200	Bio-Rad, München, D
Kodak Scientific Imaging Film	Rochester, New York, USA
Detektion: Entwickler	Protec 45 Compact, D

Methode:

Nachdem das Trenngel polymerisierte, wurde das Sammelgel mit den Ladetaschen darüber gegossen. Es wurden Proteinproben gleicher Menge verwendet. Für HO-1 und ß-Aktin wurden jeweils 100 µg pro Gesamtprobe in ein Eppendorf Gefäß gegeben. Die Proteinproben wurden 1:1 mit Laemli Puffer verdünnt, das Protein 5 min. bei 90°C denaturiert und bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt. Die Gele wurden in den Elektrophoresepuffer plaziert und die Proben in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 140 Volt für ca. 70 min. Die getrennten Proteine imTrenngel wurden dann mittels der Semi-dry Transfertechnik auf eine PVDF Membran für 40 min bei 0,05 A transferiert. Um unspezifischen Bindungen zu blockieren, wurden die Membranen in 5%iger Blot-QuickBlocker Lösung (Chemikon Kit) in PBS-Tween-20 bei

Raumtempratur für 20-30 min. inkubiert. Danach wurden die Membranen mit PBS und Tween-20 für 30 min. gewaschen.

Primäre Antikörper Behandlung:

Die primären Antikörper wurden in femto/ TBST Puffer verdünnt. Es wurden folgende Antikörper in den entsprechenden Verdünnungen verwendet:

Hämoxygenase 1 Maus-monoklonaler Antikörper; Dilution: 1:2000	#H59320, Transduction Laboratories Becton Dickinson, Heidelberg, D
ß-Aktin Maus-monoklonaler Antikörper Dilution; 1:2000	#A-5441, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA

Die Membranen wurden mit den primären Antikörpern für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Membranen mit PBS und Tween-20 Lösung für 45 min gewaschen.

Sekundäre Antikörper (Ak) Behandlung:

Meerrettich-Peroxidase-konjugierte anti-Maus Ak	#164015, Amersham, Freiburg, D
Meerrettich-Peroxidase-konjugierte anti-Kanninchen Ak	#164014, Amersham, Freiburg, D

Diese anti-Maus oder anti-Kanninchen Antikörper sind mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert und binden an den Fc Teil der primären Antikörper. Die Membranen wurden mit den sekundären Antikörpern in einer Verdünnung von 1:2000 in femto/ TBST Puffer für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach für eine Stunde in femto/ TBST Puffer gewaschen. Die Membranen wurden mit einem Chemilumineszens-Detektionssystem entwickelt. 10 µl des Detektionsreagenz-1 und 1 µl des Detektionsreagenz-2 wurden in 10 ml Detektionspuffer gemischt und darin die Membranen für ca. 3 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Filmentwicklung*:*

In einer Entwicklungskassette wurde dann der Film mit den chemilumineszierenden Proben für unterschiedliche Zeiträume (0,5-30 min) in der Dunkelkammer exponiert und entwickelt.

Wiederverwendung der Membran:

Die Membranen wurden in dem Trennpuffer bei 50°C für 60 min inkubiert. Es wurde auf 50 ml mit Aqua dest aufgefüllt. Die Membranen wurden danach mit PBS-Tween-20 Lösung für 30 min gewaschen

Der Puffer enthält:

2-Mercaptoethanol	100 mM
SDS	2%
Tris-HCl (pH 6,8)	62,5 mM

3.5 Isolation der RNA, Reverse Transkription und Polymerasekette-Reaktion

Es wurden die mRNA Expression von Hämoxygenase 1 und ß-Aktin in der Zellkultur humaner Hepatozyten nach einem standardisierten Protokoll analysiert [20].

Reagenzlösung*:*

Guanidin-Thiocyanat	4 M	#G-7028, Sigma, Deisenhofen, D
Na-Citrat dihydrat, pH 7	25 mM	#6586, Merck, Darmstadt, D
N-Lauroyl-Sarcosin	0,5%	#L-9150, Sigma, Deisenhofen, D
2-Mercaptoethanol	0,1M	#M-6250, Merck, Darmstadt, D

Vorbereitung der Stammlösung (100ml):

Guanidin-Thiocyanat (47,48 g) und Na-Citrat (0,73 g) wurden gemischt und ein pH Wert von 7.0 eingestellt. Dann wurde N-Laroyl-Sarcosin (10%) 5 ml dazugegeben. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurde in diese Stammlösung 50 ml 2-Mercaptoethanol (0,36 ml) hinzugegeben.

DEPC Wasser:

DEPC Konzentrat #D5758, Sigma, Deisenhofen, D

1ml DEPC Konzentrat wurde mit 1000 ml aqua dest. versetzt, über Nacht gemischt und vor Gebrauch autoclaviert. Diese Lösung wurde verwendet, um die RNAase zu inaktivieren.

Ladepuffer*:*

Xylencyanol FF	0,25 g	#X4126, Sigma, Deisenhofen, D
Bromphenolblau	0,25 g	#E6896, Sigma, Deisenhofen, D
Glycerol	40%	#G2025, Sigma, Deisenhofen, D

Der Puffer wurde verwendet, um die Proben in die Probetaschen zu plazieren und zu markieren.

5* TBE Puffer :

Tris Puffer	54 g	#T1503, Sigma, Deisenhofen, D
Borsäure	37,5 g	#B6768, Sigma, Deisenhofen, D
EDTA-Lösung 0,5M (pH 8)	3,722 g	#E5134, Sigma, Deisenhofen, D

wurden in 1 Liter aqua dest. gemischt, auf 1:10 mit aqua dest. verdünnt und autoklaviert. Dieser Puffer dient als Dielektrikum bei der RNA-Auftrennung.

Basenpaarleiter*:*

100 Basepaarleiter #27-4001-01, Amersham, Freiburg, D

20 µl wurden mit 162 µl 0,5x TBE Puffer und 18 µl Ladepuffer versetzt. Die Basenpaarleiter wurde verwendet, um die Basenlänge der Proben zu ermitteln.

Ethidiumbromid:

#E7637, Sigma, Deisenhofen, D

Ethidiumbromid wurde als Fluoreszenzfarbstoff für das Agarosegel verwendet. 1 g wurde in 100 ml H_2O gelöst (Stammlösung 10 mg/ml) und lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt. 0,5 ml der Stammlösung wurde in 1 ml 0,5x TBE Puffer gelöst.

dNTP´s:

100 mM dATP	#10297-018, Life Technologies, Karlsruhe, D
100 mM dCTP	
100 mm dGTP, 100 mM dTTP	

wurden gemischt und auf 25 mM verdünnt. Die Mischung wurde weiter mit DEPC Wasser 1:2,5 auf eine Stammkonzentration von 10 mM verdünnt.

Na-Acetat	#S2889, Sigma, Deisenhofen, D
Phenol	#P4682, Sigma, Deisenhofen, D
Chloroform	#C2432, Sigma, Deisenhofen, D
Isoamylalkohol	#I3643, Sigma, Deisenhofen, D
Isopropanol	#405-7, Sigma, Deisenhofen, D
Ethanol	#1.00986, Merck, Darmstadt, D
Oligo (dt)	#18418-012, Life Technologies, Karlsruhe, D
RNAase out, Rnasin (2500 U)	#N-2111, Promega, Mannheim, D
RNAase out, Rnasin (2500 U)	#N-2111, Promega, Mannheim, D
10xPCR Puffer ohne Mg	#Y02028, Life Technologies, Karlsruhe, D
$MgCl_2$	#Y02016, Life Technologies, Karlsruhe, D
DTT	#Y0014, Life Technologies, Karlsruhe, D
Superscript II RT	#18064, Life Technologies, Karlsruhe, D
Primer antisense	INTERACTIVA, Ulm, D
Primer sense	INTERACTIVA, Ulm, D
Taq Polymerase	#10342-020, Life Technologies, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	#E6896, Sigma, Deisenhofen, D
Zentrifugeröhrchen, 15 ml	#420956, Falcon, Becton Dickinson,NJ, USA

3.5.1 Isolation und Konzentrationsbestimmung der mRNA nach Chomczynski

Die Zellen wurden von den Petrischalen mit dem Zellschaber getrennt, in sterile 12 ml Röhrchen gefüllt, und mit 1500 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 500 µl Reagenzlösung resuspendiert. Danach wurde die Lösung in sterile 2,2 ml Eppendorf Röhrchen pipettiert und folgende Reagenzien hinzugegeben:

Na-Acetat	50 µl
Phenol	500 µl
Chloroform	2 µl
Isoamylalkohol	98 µl

Die Lösung wurde vorsichtig gemischt, für 15 min im Eisbehälter aufbewahrt und bei 10.000 g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der klare oberflächliche, RNA enthaltene Überstand wurde in sterile 2,2 ml Eppendorf Röhrchen mit 1 ml Isopropanol (30%) pipettiert, erneut inkubiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 300 µl Reagenzlösung und 300 µl Isopropanol (30%) resuspendiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Pellet wurde zunächst mit 1 ml Ethanol (75%) resuspendiert und zentrifugiert, um die Präzipitation der Proben zu ermöglichen. Zuletzt wurde das Pellet mit DEPC Wasser gelöst und die RNA bei -20° C gelagert.

3.5.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der mRNA in cDNA wurde durchgeführt, um die Expression des HO-1 Genes und des ß-Aktin Genes im Rahmen der RNA-Synthese nachzuweisen. In 0,2 ml PCR-Röhrchen wurden 2 µg (2 µl) je Gesamt RNA-Proben eingesetzt und mit folgenden Reagenzien versetzt:

Oligo (dt)	1 µl
RNAase out, Rnasin (2500 U)	1 µl

und mit DEPC Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Die Proben wurden im Thermocycler bei 70°C für 10 Minuten amplifiziert und dann bei 4°C für 10 Minuten aufbewahrt. Für den nächsten Schritt der reversen Transkription wurde zwischenzeitlich eine Lösung folgender Reagenzien vorbereitet und bei 4°C aufbewahrt.

für eine Probe:

10 x PCR Puffer ohne Mg	2 µl
$MgCl_2$ 25 mM	2 µl
dNTP 10 mM	1 µl
DTT 0,1 M	2 µl

7 µl dieser Lösung wurde zu den Proben pipettiert. Die Proben wurden für weitere 5 min bei 42°C im Thermocycler inkubiert. Danach wurde jeweils 1 µl Superscript

II RT(10 000 U) zu den Proben gegeben. Daraufhin wurden die Proben für 50 min bei 42°C und dann für 15 min bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Die umgeschriebene cDNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.5.3 Polymerasekettenreaktion

Es wurden 100 ng (2 µl) der cDNA-Probe mit den Reagenzien wie in der folgenden Tabelle angegeben gemischt, um HO-1 und ß-Aktin cDNA zu amplifizieren.

Tab. 1: Schrittfolge der Polymerasekettenreaktion

Reagenzien:	HO-1	ß-Actin
cDNA (100 ng)	2 µl	2 µl
10x PCR Puffer ohne Mg		
dNTP (10 mM)	0,25	0,25
Primer-antisense (5 µM)	0,25	0,25
Primer-sense (5 µM)	0,25	0,25
Taq Polymerase (500 U)	1,25	1,25
$MgCl_2$ (50 mM)	1	1,25
DEPC Wasser	bis auf 20 µl	
PCR:		
1. Denaturierung der DNA-Stränge	96°C, 3 min	94°C, 1 min
Amplifikationszyklen:		
2. Denaturierung	96°C, 30 sec	96°C, 30 sec
3. Annealing	50°C, 30 sec	58°C, 1min
4. Extension	72°C, 90 sec	72°C, 2 min
Zyklen (2,3,4)	35	29
Letzte Inkubation	10 min	10 min

Im folgenden werden die Primer der verwendeten PCR dargestellt.

ß -Actin

ß-Aktin ist Bestandteil des Zytoskeletts und wird in jeder Zelle expremiert. Der Nachweis einer gleichmäßigen Expression des ß-Aktins bedeutet, dass die mRNA Proben in gleichen Mengen vorhanden waren.

Antisense:	5’ ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA 3’
Sense	5’ CGG AAC CGC TCA TTG CC 3’

Unter Verwendung dieser Primer wurde das ß-Aktin mit einer Größe von 289 Basenpaaren synthetisiert.

HO-1

Antisense:	5' TGC GGT GCA GCT CTT CTG 3'
Sense:	5’GCA ACC CGA CAG CAT GC 3'

Unter Verwendung dieser Primer wurde das HO-1 Amplifikationsprodukt mit einer Größe von 244 Basepaaren synthetisiert. Als Positivkontrolle der HO-1 wurden humane Hepatozyten mit CoPP stimuliert [44].

Agarosegel*:*

Agarose NEEO Ultra-quality	#2267.4, Roth, Karlsruhe, D

Die Agarose wurde in einem Meßbecher mit einer Verdünnung von 1:100 in 0,5x TBE Puffer gelöst und bei 360°C für 4 min in der Mikrowelle erhitzt. Danach wurde 3 µl vorbereitetes Ethidiumbromid in die Gellösung gemischt. Das Gel wurde in die Gelkammer gegossen und ein Kamm für die entsprechenden Taschen plaziert.

Einfüllen der Proben:

Current Supply, Bio Rad Power Pac 200	Bio-Rad, München, D
UV-Platte	Biozym, Oldendorf, D
Gel Caspase	Biometra T13, Göttingen, D

Das fertige Gel wurde in der Elektrophoresekammer plaziert und mit einem Laufpuffer (0,5x TBE Puffer) aufgefüllt. Dann wurde jede Probe (20 µl) mit 4 µl Ladepuffer (Bromphenolblau) gemischt. 3 µl von diesem Gemisch wurde in die entsprechenden Geltaschen pipettiert. Es wurden die Basepaarleiter in die erste und Positiv- und Negativkontrollen in die letzten Taschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 80 V für 1,5 h durchgeführt. Die Auswertung erfolgte unter der UV Lichtplatte.

3.6 Lactat-Dehydrogenase (LDH) und Aspartat Aminotransferase (AST) Bestimmung:

LDH Messung:

LDH opt. EC 1.1.1.27 Test-UV	#DG1340-K, Sigma, Deisenhofen, D
Multi-enzym Lin-Trol	#M-2266, Sigma, Deisenhofen, D
Fluostar Galaxy,	BMG Labor Technologies Offenburg, D

Ein Anstieg der LDH Aktivität wird unter vielen pathologischen Bedingungen beobachtet. Die Freisetzung dieses intrazytoplasmatischen Enzyms in das Zellkulturmedium gibt Aufschluß über die Zellschädigung, insbesondere des LDH-5 Isoenzyms der Leber. Die LDH Aktivität wird photometrisch über den NADH-Extinktionsabfall mit Hilfe eines kinetischen UV-Test Kits bestimmt [48].

Bestimmungsmethode*:*

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \Leftrightarrow \text{L-Lactat} + \text{NAD}^+$$

Die Methode wurde für den Einsatz in Mikrotiterplatten modifiziert. Reagenz A wurde in 20 ml aqua dest. und Reagenz B in 5 ml aqua dest. verdünnt. 0,8 ml von Reagenz B wurde mit 20 ml Reagenz A kombiniert. Multi-enzym Lin-Trol diente als Standardkontrollserum. Es wurde in 3 ml aqua dest. gelöst mit Endaktivität von 2000 U/l. Dann wurde es mit 0,9% NaCl (40 µl Standard + 600 µl 0,9% NaCl) verdünnt, um die höchste Standardkonzentration von 125 U/l zu erhalten. Der Ansatz für die Standardreihe (für die 96 Well-Mikrotiterplatte) wurde jeweils um 1:2 verdünnt mit einer niedrigsten Aktivität von 1,95 U/l. Als Leerwert diente 0,9% NaCl. 20 µl der Proben und Standardansätze wurden jeweils mit 200 µl der Mischung aus Reagenz A und B in der Mikrotiterplatte gemischt. Die Messung wurde schrittweise durchgeführt, die ersten Messungen 30 s nach dem Start und die zweiten nach 10 min bei einer Extinktion von 340 nm bei 25°C mit dem Platten-Lese-Programm von BGM (Fluostar Galaxy). Die Aktivität wurde aus der Differenz zwischen beiden Messungen ermittelt.

AST Messung:

GOT opt. EC 2.6.1.1 UV-Test	#DG158-K, Sigma, Deisenhofen, D
Multi-enzym Lin-Trol	#M-2266, Sigma, Deisenhofen, D
Anthos Spektrophotometer	#ht II, Salzburg, Au

AST kommt in Hepatozyten in den Mitochondrien und im Zytoplasma vor. Die Freisetzung dieses intrazytoplasmatischen Enzyms in das Zellkulturmedium gibt Aufschluß über die Zellschädigung der Leber. Die Aktivität der AST wird ebenfalls über den NADH-Extinktionsabfall der gekoppelten Reaktion mit Malatdehydrogenase photometrisch mit einem kommerziell erhältlichen Sigma Test Kit gemessen [48].

Bestimmungsmethode

L-Aspartat + 2-Oxaloacetat ⇔ Oxaloacetat + L-Glutamat

Oxaloacetat + NADH ⇔ L-Malat + NAD

Diese Methode wurde ebenfalls für den Einsatz in Mikrotiterplatten modifiziert. Reagenz A wurde in einem Volumen von 20 ml aqua dest. und Reagenz B in 16 ml aqua dest. verdünnt. 0,8 ml von der verdünnten Reagenz B Lösung wurde mit 10 ml Reagenz A Lösung kombiniert. Multi-enzyme Lin-Trol diente als Standardkontrollserum. Es wurde in 3 ml aqua dest gelöst und hatte eine Aktivität von 1130 U/l. Dann wurde es mit 0,9% NaCl (40 µl Standard + 280 µl 0,9% NaCl) verdünnt, um die höchste Standardkonzentration von 141,25 U/l zu erhalten. Der Ansatz für die Standardreihe (für die 96 Well-Mikrotiterplatte) wurde jeweils um 1:2 verdünnt mit der niedrigsten Aktivität von 2,207 U/l. Als Leerwert diente 0,9% NaCl. 50 µl der Proben und Standardansätze wurden jeweils mit 200 µl der Mischung aus Reagenz A und B in der Mikrotiterplatte gemischt. Die Messung wurde schrittweise durchgeführt, die ersten Messungen 30 s nach dem Start und die zweiten nach 10 min bei einer Extinktion von 340 nm bei 25°C mit dem Platten-Lese-Programm von BGM (Fluostar Galaxy). Die Aktivität wurde aus der Differenz zwischen beiden Messungen ermittelt.

3.7 HO-1 Aktivität

Die HO-1 Enzymaktivität wurde mit zwei verschiedenen Methoden aus der Messung der Endprodukte des Hämabbaus, Eisen-II und Bilirubinbildung, bestimmt.

3.7.1 Eisenbestimmung

Eisen ist ein Endprodukt des Hämabbaus, der durch die HO-1 katalysiert wird. Aus der Messung der Eisenkonzentration kann auf die Aktivität der HO-1 geschlossen werden [53].

Hepatozytenisolation für die Fe Messung:

Die Zellen wurden von den Petrischalen mit einem Zellschaber gelöst und mit dem Medium in ein Falcon Röhrchen transferiert und bei 3500 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde das Sediment in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -20°C bis zur Messung aufbewahrt.

Fe2+- und Gesamteisenbestimmung

Reagenzien:

Eisen(II)-sulfat (Hepthydrat)	#44970, Fluka, Deisenhofen, D
Na-Bathophenantholindisulfonat 510 µM	#1375, Sigma, Deisenhofen, D
L(+)-Ascorbinsäure 1,14 M	#127.0250, Merck, Darmstadt, D
TCA (Trichlorsäure, 20%) 1,23 M	#T4885, Sigma, Deisenhofen, D
HCl 1 N	#1.09057, Merck, Darmstadt, D
H_2SO_4 0,01 N	#K219577, Merck, Darmstadt, D
Na-Acetat Puffer 1,2 M	#1.01539, Merck, Darmstadt, D

Farbreagenz:

Natrium-Bathophenanthrolindisulfonsäure (510 µM) wurde in Na-Acetat Puffer (1,2 M) gelöst und der pH Wert auf 4,5 mit Essigsäure eingestellt.

Standards:

2,2 mg Fe^{2+}-sulfat wurde in 10 ml H_2SO_4 auf eine Konzentration von 800 µM gelöst. Danach wurde der Ansatz mit H_2O (100 µl Fe^{2+}-sulfat/ H_2SO_4 + 900 µl H_2O) verdünnt, um die höchste Standardkonzentration von 80 µM zu erhalten. Danach wurde der Standardansatz schrittweise 1:2 bis auf eine Endkonzentration von 1,25 µM verdünnt.

Präparation der Standardkurve (Doppelbestimmung)

Fe^{2+}-standard	300 µl
1N HCl	100 µl
H_2O	100 µl

Die Reagenzien wurden gemischt und 200 µl davon in einen Mikrotiterplatte pipettiert. Das Farbreagenz wurde gemischt und mit dem Platten-Lese-Programm von Fluostar Galaxy bei 550 nm gemessen.

Mikrosomenpräparation der Zellen

Die Proben wurden bei 10000 g für 20 min zentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt und mit 100 µl aqua dest. resuspendiert. 50 µl werden jeweils für die Fe^{2+} und für die Gesamteisenbestimmung in Eppendorfröhrchen pipettiert.

Fe2+/Gesamteisenmessung

Die 50 µl Probe wurde mit 50 µl HCl (1N) gemischt und bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Danach wurden 50 µl H_2O (für Fe^{2+}) oder 50 µl Ascorbinsäure (für Gesamteisen) hinzugefügt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 50 µl TCA hinzugegeben und zentrifugiert. 200 µl des Überstandes wurden mit 125 µl Farbreagenz in einer Mikrotiterplatte versetzt und bei 550 nm gemessen.

Proteinmessung (siehe 3.3.2)

Die Proteinkonzentration wurde aus dem verbleibenden Pellet der zentrifugierten Proben bestimmt.nach der Gleichung: und der Eichgerade :

$$Fe(Gesamt) - Fe(II) = Fe(III)$$

3.7.2 Bestimmung der HO-1 Aktivität: Bilirubin-Messung

Reagenzien*:*

Hemin	#H-5533, Sigma, Deisenhofen, D
$MgCl_2$	#M-8266, Sigma, Deisenhofen, D
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase	#G-8404, Sigma, Deisenhofen, D
Glucose-6-Phosphat	#G-7879, Sigma, Deisenhofen, D
Nicotinadenin-dinukleotid Phosphat ($NADP^+$)	#N-0505, Sigma, Deisenhofen, D

Kaliumphosphat Puffer (pH 7.4):

KH_2PO_4	0,2 M	#P-5379, Sigma, Deisenhofen, D
K_2HPO_4	0,2 M	#P-8281, Sigma, Deisenhofen, D

Um 0,1 M Kaliumphosphatpuffer zu erhalten, wurden 0,2 M KH_2PO_4 und 0,2 M K_2HPO_4 1:1 gemischt und ein pH Wert von 7,4 eingestellt. Die HO-1 Aktivität wurde nach der Methode von Juckett et al. durch Bildung von Bilirubin gemessen [52]. Um die HO-1 Aktivität zu messen, wurden 6 x 10^6 Hepatozyten in 90 mm Petrischalen kultiviert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst, zweimal mit PBS Puffer gewaschen und bei 1200 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Danach wurden die Proben in 100 µl Pi-Puffer gelöst und bei 100 000 g für 60 min bei 4°C zentrifugiert, um die Mikrosomen zu erhalten. Der Überstand wurde nach Messung der Proteinkonzentration bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Für den HO-1 Versuch wurden 100-300 µg des mikrosomalen Proteins mit folgenden Reagenzien inkubiert:

	Volumen (total 0,5 ml)
Heme (Hemin) 50 µM	10 µl
humanes Leberzellzytosol (mikrosomale Fraktion des Überstands mit Biliverdin Reductase) 2 mg/ ml	
$MgCl_2$ 1 mM	20 µl
Glucose-6-phosphat Dehydrogenase 3 U	0,9 µl
Glucose-6-phosphat 1 mM	20 µl
$NADP^+$ 2 mM	50 µl

Diese Reagenzien wurden mit 0,1 M Kaliumphosphat Puffer (pH 7,4) aufgefüllt und für 30 min bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Proben auf Eis plaziert wurden. Das Endprodukt dieser Reaktion, Bilirubin, wurde mit dem Scanning Spektrophotometer aus der Differenz der Extinktionen zwischen 450 nm und 530 nm bestimmt. Die Konzentration wurde aus dem Extinktionsquotienten für Bilirubin (40 M/ cm) errechnet. Die Wellenlänge des Bilirubins hat sein Maximum bei 467 nm. Das Ergebnis wurde in pmol Bilirubin/ mg Protein/ min angegeben.

3.8 Experimentenübersicht:

Serumfreies Medium:

Vor jedem Experiment wurden die Zellen für 6 h mit serumfreiem Medium inkubiert. Zu Beginn des Experimentes wurde das Medium gegen serumfreies und mit den im Protokoll aufgeführten Reagenzien vorbereitetes Medium gewechselt. Dieses Medium wurde erwärmt, um eine Kältestimulation zu vermeiden.

Williams' E Medium 500 ml	#32551-020, Life Technologies, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin 100 U/ 100 µg/ml	#15140-023, Life Technologies, Karlsruhe, D
Insulin 1 µM	#I-5500, Sigma, Deisenhofen, D
Hepes Puffer 15 mM	#15630-056, Life Technologies, Karlsruhe, D

Reagenzien:

IFN-γ	100 U/ml	#I6507, Sigma, Deisenhofen, D
TNF-α	500 U/ml	#T1042, Sigma, Deisenhofen, D
IL-1β	10 U/ml	#I4638, Sigma, Deisenhofen, D
LPS 5 µg/ml (E. coli 0111:B4)		#L-3012, Sigma, Deisenhofen, D
Hemin	10 µM	#H-5533, Sigma, Deisenhofen, D
CoPP	100 µM	#C-1900, Sigma, Deisenhofen, D
SNAP	0.5 mM	#A-2509, Sigma, Deisenhofen, D
H_2O_2	100-100 µM	#H1009, Sigma, Deisenhofen, D
Actinomycin D	1 µg/ml	#A1410, Sigma, Deisenhofen, D
Cycloheximid	10 µg/ml	#C7698, Sigma, Deisenhofen, D

Es wurden die folgende Experimente durchgeführt und zu den im Protokoll angegebenen Zeitpunkten die Proben aufbereitet.

3.8.1 Zytokin- und Endotoxinstimulation

Um die Regulation der HO-1 bei der Sepsis oder bei der Inflammation während der Leberoperationen zu verstehen, haben wir diese Schädigungsmuster simuliert, und humane Hepatozyten mit verschiedenen Kombinationen von Zytokinen, IL-1β, IFN-γ, TNF-α und/ oder Endotoxin (LPS) behandelt [84, 85].

Tab. 2: Zytokin- und Endotoxinstimulation

Reagenzien:	Methode	Zeitabstände
Einzelstimulation: IL-1β (10 U/ml) IFN-γ (100 U/ml) TNF-α (500 U/ml) LPS (5 µg/ml)	HO-1 mRNA	0,5-1-3-6 h
	HO-1 Proteinnachweis	0,5-1-3-6-12 h
	LDH-AST	0,5-1-3-6-12 h
Kombinierte Stimulation IL-1β + IFN-γ IL-1β + TNF-α IL-1β + LPS IFN-γ + TNF-α IFN-γ + LPS TNF-α + LPS IL-1β + IFN-γ + TNF-α IL-1β + IFN-γ + LPS IL-1β + TNF-α + LPS IFN-γ + TNF-α + LPS IL-1β + IFN-γ + TNF-α + LPS	HO-1 mRNA	0,5-1-3-6 h
	HO-1 Proteinnachweis	
	LDH-AST	
CM (Zytokinmix) IL-1β + IFN-γ + TNF-α + LPS	HO-1 mRNA	0,5-1-3-6-12-24 h
	HO-1 Proteinnachweis	
	LDH-AST	
	HO-1 Aktivität	4 h

3.8.2 Induktion von HO-1 durch warme und kalte Ischämie

In diesen Experimenten wurden die Bedingungen für zwei typische Leberoperationen, die Leberresektion (warme Ischämie) und die Lebertransplantation (kalte Ischämie) an der Zellkultur simuliert. Dazu wurden die Kulturschalen in einer abgeschlossenen, luftdichten Kammer bei 37°C, 4°C bei kontinuierlichem Einstrom von 100% N_2 (1,5 bar) inkubiert [62, 94].

Tab. 3: Induktion von HO-1 durch warme und kalte Ischämie

Experimentelle Bedingungen	Methode	Zeitabstände
37°C / 4°C 100% N_2 (1,5 bar)	HO-1 mRNA	0,5-1-3-6-12-24 h
	HO-1 Proteinnachweis	
	LDH-AST	
	Fe Messung	
	HO-1 Aktivität	4 h
Prästimulation 0,5 h Actinomycin D (1 µM) + 37°C / 4°C 100% N_2 (1,5 bar)	HO-1 mRNA	0,5-1-3-6-12 h
Prästimulation 0,5 h Cycloheximide (10 µM) + 37°C / 4°C 100% N_2 (1,5 bar)	HO-1 Proteinnachweis	0,5-1-3-6-12 h

3.8.3 Einfluß der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf die HO-1 Expression

Um den Einfluß der ROS während der Reperfusionsphase nach Leberoperationen und Transplantationen zu untersuchen, wurden die Hepatozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen von H_2O_2 (100-1000 µM) behandelt [41, 56, 57, 95, 104].

Tab. 4: Einfluß reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf HO-1 Expression

Reagenzien:	Methode	Zeitabstände
H_2O_2 (100/ 200/ 500/ 1000 µM)	HO-1 mRNA	6 h
	HO-1 Proteinnachweis	
	LDH-AST	

3.8.4 Einfluß von NO auf die HO-1 Expression

Zahlreiche Arbeiten weisen daraufhin, dass NO (ein wichtiger Signalüberträger) und HO-1 sich gegenseitig beeinflussen [3, 52, 64, 115]. Deshalb wurden in einem weiteren Experiment Hepatozyten mit SNAP (0,5 mM), einem NO-Spender, behandelt, um zu untersuchen, in wie weit die Anwesenheit von NO die Expression von HO-1 beeinflußt.

Tab. 5: Einfluß von NO auf die HO-1 Expression

Reagenzien:	Methode	Zeitabstände
SNAP (0,5 mM)	HO-1 mRNA	0,5-1-3-6-12-24 h
	HO-1 Proteinnachweis	
	LDH-AST	

3.8.5 Einfluß von CoPP und Hemin auf die HO-1 Expression

CoPP [65, 72, 101] und Hemin [75, 87, 119] wurden als Stimulatoren der HO-1 Genexpression und Enzymaktivität verwendet. Um den Effekt von CoPP auf den verschiedenen Regulationsebenen zu untersuchen, wurden die Zellen mit Actinomycin D, das die mRNA Synthese blockiert, und mit Cycloheximide, das die Proteinsynthese blockiert, behandelt. Weiterhin wurden die Zellen mit CoPP und Hemin stimuliert und die HO-1 mRNA und Proteinbestimmung zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt.

Tab. 6: Einfluß von CoPP und Hemin auf HO-1 Expression und Neusynthese der HO-1

Reagenzien:	Methode	Zeitabstände
CoPP (10 µM)	HO-1 mRNA HO-1 Proteinnachweis LDH-AST	0,5-1-3-6-12 h
Prästimulation 0,5 h Actinomycin D (1 µM) + CoPP (10 µM)		
Prästimulation 0,5 h Cycloheximide (10 µM) + CoPP (10 µM)		
Hemin (10 µM)	HO-1 mRNA HO-1 Proteinnachweis LDH-AST Fe Messung	0,5-1-3-6-12-24 h

3.8.6 Pharmakologische Prästimulation der Hepatozyten zur Protektion des ischämischen Zellschadens

Um die HO-1 zum Zeitpunkt des Eintretens des ischämischen Zellschadens als Schutzmechanismus bereits aktiviert zu haben, wurden die Hepatozyten vor der warmen und kalten Ischämie mit CoPP oder mit Hemin für 9 h, welche als maximale Expressionszeit angegeben wurde, prästimuliert [15, 106].

Tab. 7: Pharmakologische Prästimulation der Hepatozyten zur Protektion des ischämischen Zellschadens

Reagenzien:	Methode	Zeitabstände
Prästimulation CoPP (1-10-50 µM) -9 h + 37°C / 4°C 100% N_2 (1,5 bar)	LDH-AST	24 h
Prästimulation Hemin (1-10 µM) -9 h + 37°C / 4°C 100% N_2 (1,5 bar)	LDH-AST	24 h

3.8.7 HO-1 Aktivität unter inflammatorischen und ischämischen Bedingungen

In diesem Experiment wurde untersucht, ob die HO-1 mRNA- und Proteinexpression mit der HO-1 Aktivität unter verschiedenen inflammatorischen und ischämischen Bedingungen korreliert.

Tab. 8: HO-1 Aktivität unter inflammatorischen und ischämischen Bedingungen

Reagenzien:	Methode	Zeitabstände
CM	HO-1 Aktivität	4 h
37°C 100% N_2 (1,5 bar)		
4°C 100% N_2 (1,5 bar)		

3.9 Statistische Analyse

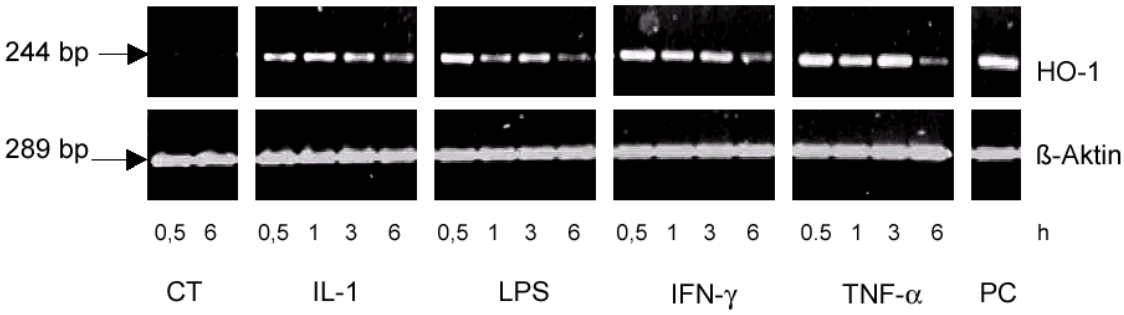
Mit einer Varianzanalyze („analysis of variance“ – ANOVA) kann eine Aussage über den Effekt mehrerer unabhängiger Variablen gegenüber einer kontinuierlichen abhängigen Variablen getroffen werden, wenn es sich um nominale (nicht kontinuierliche) Variablen handelt. Die geringe Fallzahl von $n_{Analyse}$= 5 Experimenten pro Gruppe oder Zeitpunkt, machte in dieser Studie eine ANOVA-Varianz-Analyse, die zur Auswertung vieler Experimente herangezogen

wird, sinnvoll. In einem faktoriellen Experiment mit einer oder mehreren nominalen Variablen, w.z.B. LDH Freisetzung in verschiedenen Zeitintervallen, und eine einzelne kontinuierliche Variable, w.z.B. abhängige Variable-warme Ischämie, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Sie wurde vorgenommen (ANOVA), um herauszufinden, ob sich die visuellen Beobachtungen mit Zahlen untermauern lassen. Die Nullhypothese war, daß es keinen signifikanten Unterschied in z.B. LDH Freisetzungen der verschiedenen Zeitintervallen eines Experimentes gab und die Ergebnisse deuteten an, daß diese Hypothese zurückgewiesen werden konnte. Die Veränderungen der LDH und AST Freisetzungen sowie die Bildungen von Fe-II and Bilirubin nach Exposition von warmer und kalter Ischämie, Zytokinmix, sowie durch NO- oder H_2O_2 Zufuhr oder nach Exposition mit CoPP und Hemin wurden mit der unbehandelten Kontrollgruppe oder positiven Kontrollgruppen verglichen. Bei einem p-Wert $< 0,05$ in der ANOVA-Analyse wurden anschließende faktorielle Tests zum nominellen Niveau von 5% (95% Konfidenzintervall) durchgeführt. Für den paarweisen Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen untereinander wurde der t-Test verwendet.Die Grafiken im folgenden Ergebnisteil zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung der verschiedenen Gruppen. Signifikante Veränderungen, die sich im t-Test zeigten, wurden in den Diagrammen mit dem Symbol * für $p < 0,05$ gekennzeichnet. Alle statistischen Tests wurden mit den statistischen Auswertungsprogramm StatView gerechnet [1].

4 Ergebnisse

4.1 Einfluß von Zytokinen und Endotoxin auf die Expression der HO-1 mRNA, des HO-1 Proteins und auf die zelluläre Schädigung

In allen Kontrollgruppen war die HO-1 mRNA Expression auf basale Aktivität nachweisbar, die als Basisexpression angesehen wurde. Die Exposition der humanen Hepatozyten mit IFN-γ, TNF-α, IL-1β und LPS induzierte einen Anstieg der HO-1 mRNA Expression. Nach Einzelzytokin- und Endotoxinexposition war ein Anstieg bereits nach 0,5 h nachweisbar, erreichte nach 3 h ein Maximum und sank nach 6 h wieder ab. IFN-γ rief die stärkste HO-1 mRNA Expression hervor und wurde von TNF-α, LPS und IL-1β gefolgt (Abb. 3). Bei unterschiedlichen Zytokinkombinationen (Abb. 4) wurde ein Expressionsmaximum der HO-1 mRNA bereits nach 0,5 h beobachtet, das bis zu 6 h anhielt. Ein Anstieg der HO-1 mRNA Expression nach der Stimulation mit Zytokinen plus Endotoxin (Zytokinmix, CM) war auch nach 0,5 h nachweisbar mit einem Maximum nach 3-6 h und einem Abfall nach 24 h auf das Ausgangsniveau (Abb. 5). In allen Kontrollkulturen konnten wir eine basale HO-1 Protein Expression nachweisen. Nach Stimulation der humanen Hepatozyten mit den einzelnen Zytokinen (IFN-γ, TNF-α, IL-1β) oder LPS wurde nach 0,5 bis 1 h ein Anstieg der HO-1 Proteinexpression beobachtet, der bis zu 6 h anhielt (Abb. 3). CM induzierte einen Anstieg des HO-1 Proteins ebenfalls nach 1 h und hielt bis zu 24 h an (Abb. 5). Über den gesamten Zeitverlauf bestanden keine signifikanten Unterschiede der LDH und AST Konzentrationen zwischen den mit den einzelnen Zytokinen stimulierten Gruppen und der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu führte CM zu einem signifikanten Anstieg der LDH und AST Konzentrationen im Kulturmedium nach 12 h (Abb. 5).



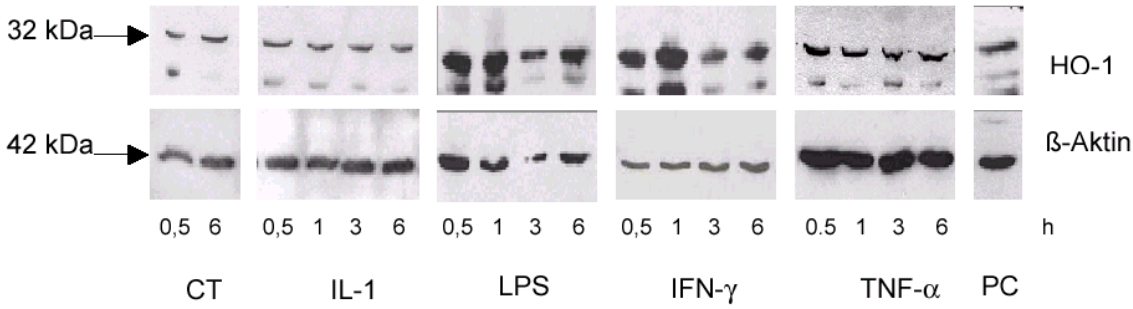


Abb. 3: Die Expression der HO-1 mRNA (oben) und des HO-1 Proteins (unten) nach Stimulation mit einzelnen Zytokinen (IL-1β, TNF-α, IFN-γ) und Endotoxin über 6 h. (CT, Kontrolle; PC, Positivkontrolle)

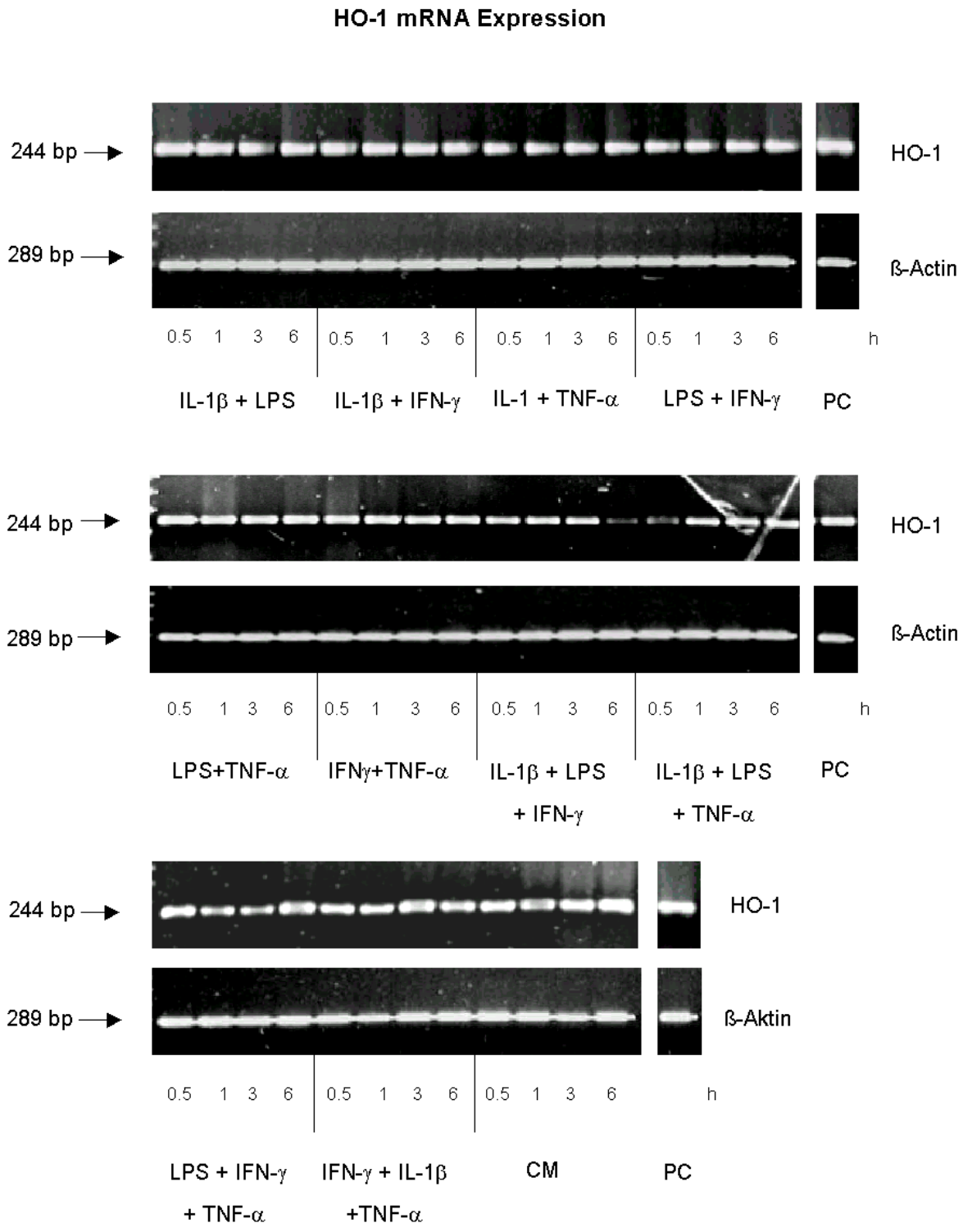


Abb. 4: Die Expression der HO-1 mRNA nach Stimulation mit verschiedenen Zytokin- (IL-1β, TNF-α, IFN-γ) und Endotoxinkombinationen über 6 h. (CT, Kontrolle; PC, Positivkontrolle)

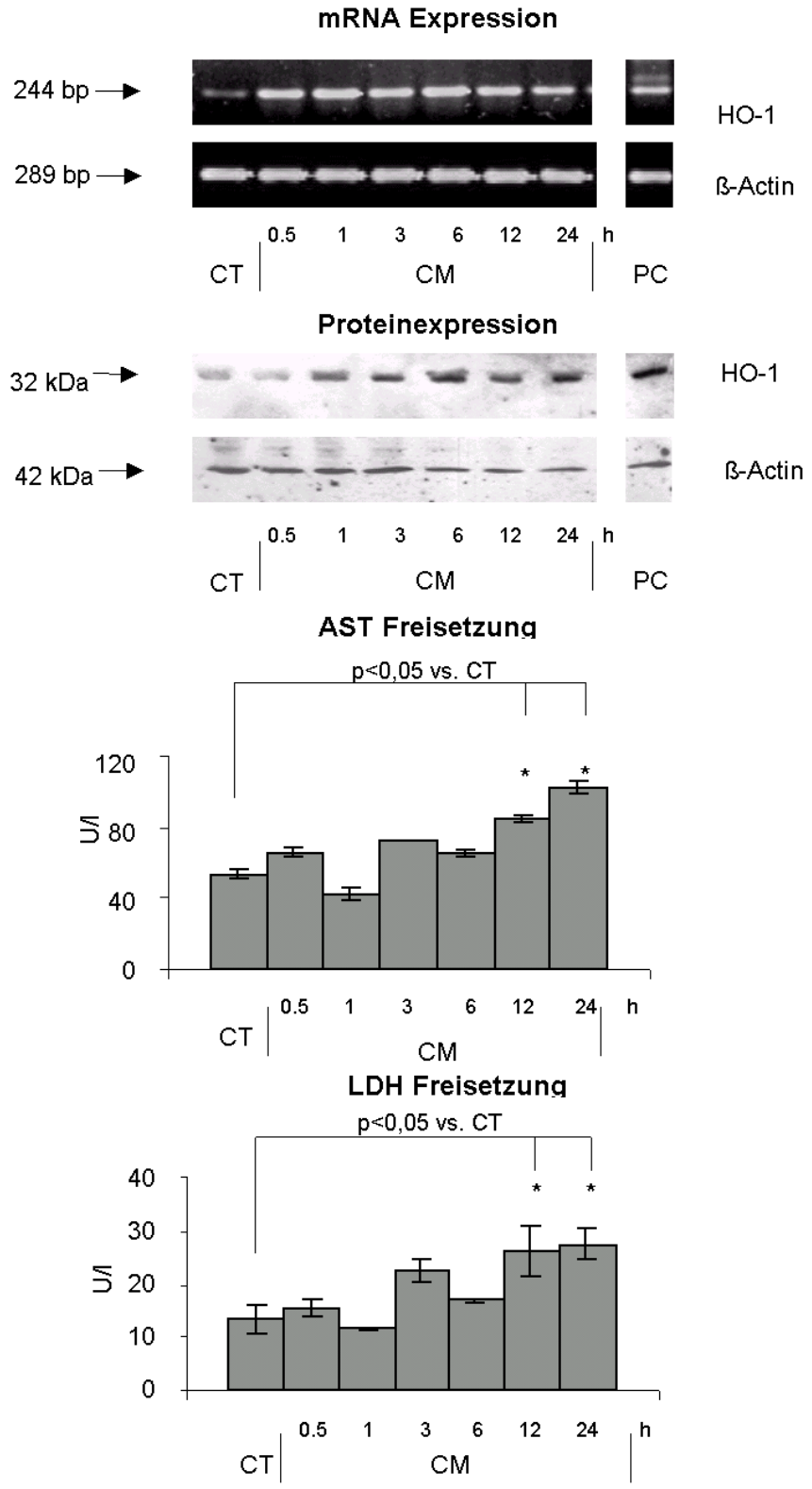


Abb. 5: Die Expression der HO-1 mRNA (oben), des HO-1 Proteins (mitte) und LDH und AST Freisetzungen (unten) nach Stimulation mit Zytokinmix (IL-1β, TNF-α, IFN-γ und LPS) über 24 h. (CT, Kontrolle; PC, Positivkontrolle, Signifikanter Unterschied gegenüber CT *p<0,05)

4.1 Einfluß der warmen Ischämie auf die Expression der HO-1 mRNA und Proteinexpression sowie deren Effekte auf die zelluläre Schädigung

Die humanen Hepatozyten wurden über 24 h einer warmen Ischämie ausgesetzt. Dabei wurde bereits nach 0,5 h ein signifikanter Anstieg der HO-1 mRNA Expression im Vergleich zur niedrigen Basisexpression in der Kontrollgruppe beobachtet (Abb. 6). Dieses Expressionsniveau blieb bis zu 12 h konstant, konnte aber nach 24 h nicht mehr nachgewiesen werden. Die HO-1 Proteinexpression stieg ebenfalls nach 0,5 h an und war bis zu 24 h konstant nachweisbar (Abb. 6). Die AST Konzentration stieg kontinuierlich bis zu einem Maximum nach 24 h (115,0±4,35 U/l vs. 53,5±2,5 U/l Kontrollgruppe) signifikant an. Eine signifikante LDH Freisetzung wurde jedoch erst nach 6 h warmer Ischämie beobachtet; mit einem Maximum nach 24 h (58,7±9.1 U/l vs.13,3±2,6 U/l Kontrollgruppe).

4.2 Einfluß der kalten Ischämie auf die Expression der HO-1 mRNA und Proteinexpression sowie deren Effekte auf die zelluläre Schädigung

Die humanen Hepatozyten wurden über 24 h einer kalten Ischämie ausgesetzt. Sie induzierte die HO-1 mRNA Expression nach 1 h, die bis zu 24 h konstant nachweisbar war (Abb. 7). Das HO-1 Protein war über den gesamten Versuchsverlauf einschließlich in der Kontrollgruppe nachweisbar. Es wurde zwischen 0,5-3 h intensiver exprimiert (Abb. 7). Die kalte Ischämie führte zu einem Anstieg der AST Freisetzung aus den Hepatozyten mit einem Maximum nach 24 h (107,2±17,5 U/l vs. 53,5±2,5 U/l Kontrollgruppe). Die LDH Freisetzung stieg ebenfalls bei der kalten Ischämie an und erreichte ihr Maximum nach 24 h (47.2±8.9 U/l).

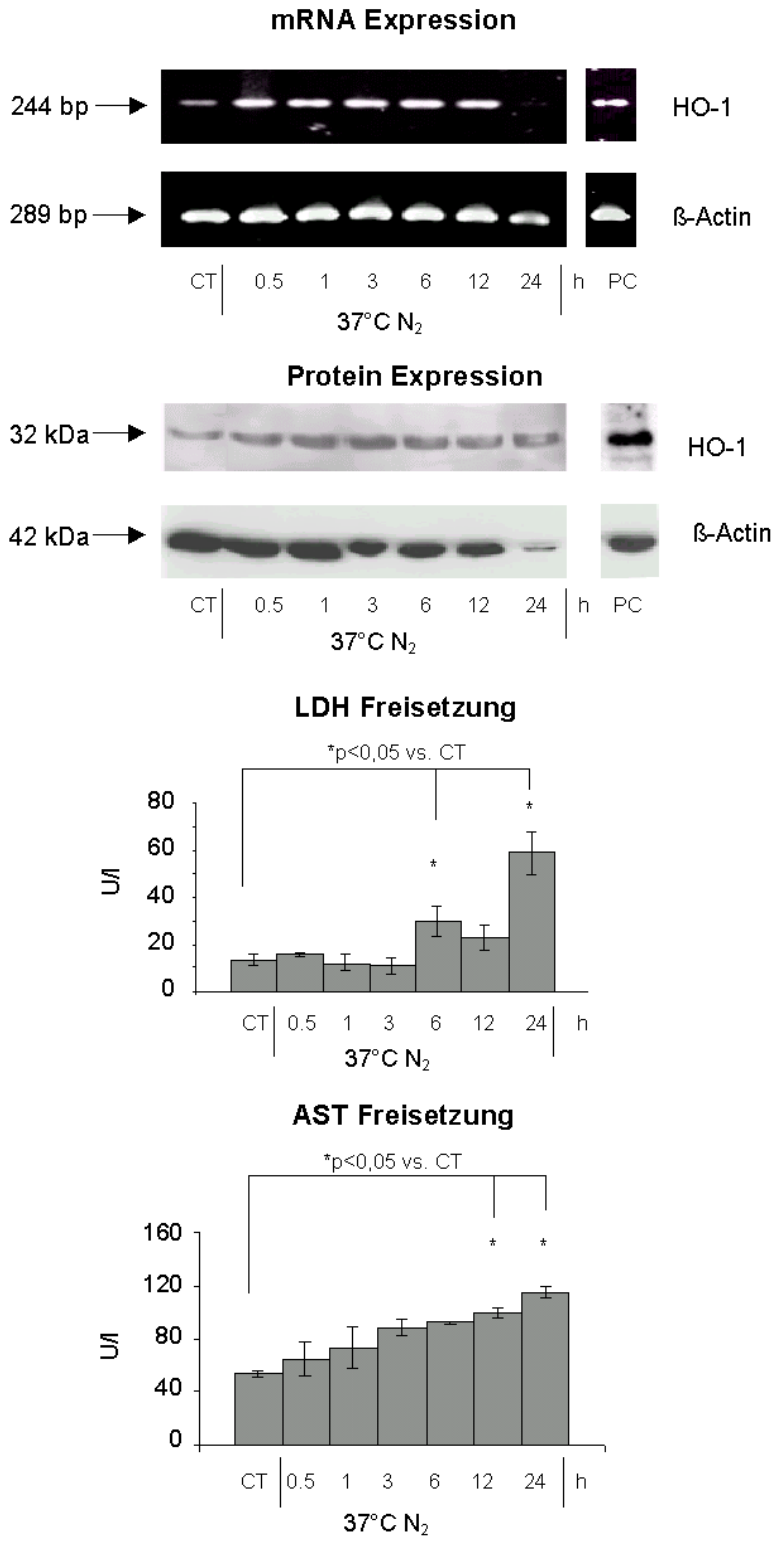


Abb. 6: Zeitabhängige Expression der HO-1 mRNA (oben) und des Proteins (mitte) sowie der LDH und AST Freisetzungen (unten) nach **warmer** Ischämie über 24 h. (Signifikanter Unterschied gegenüber CT *p<0,05)

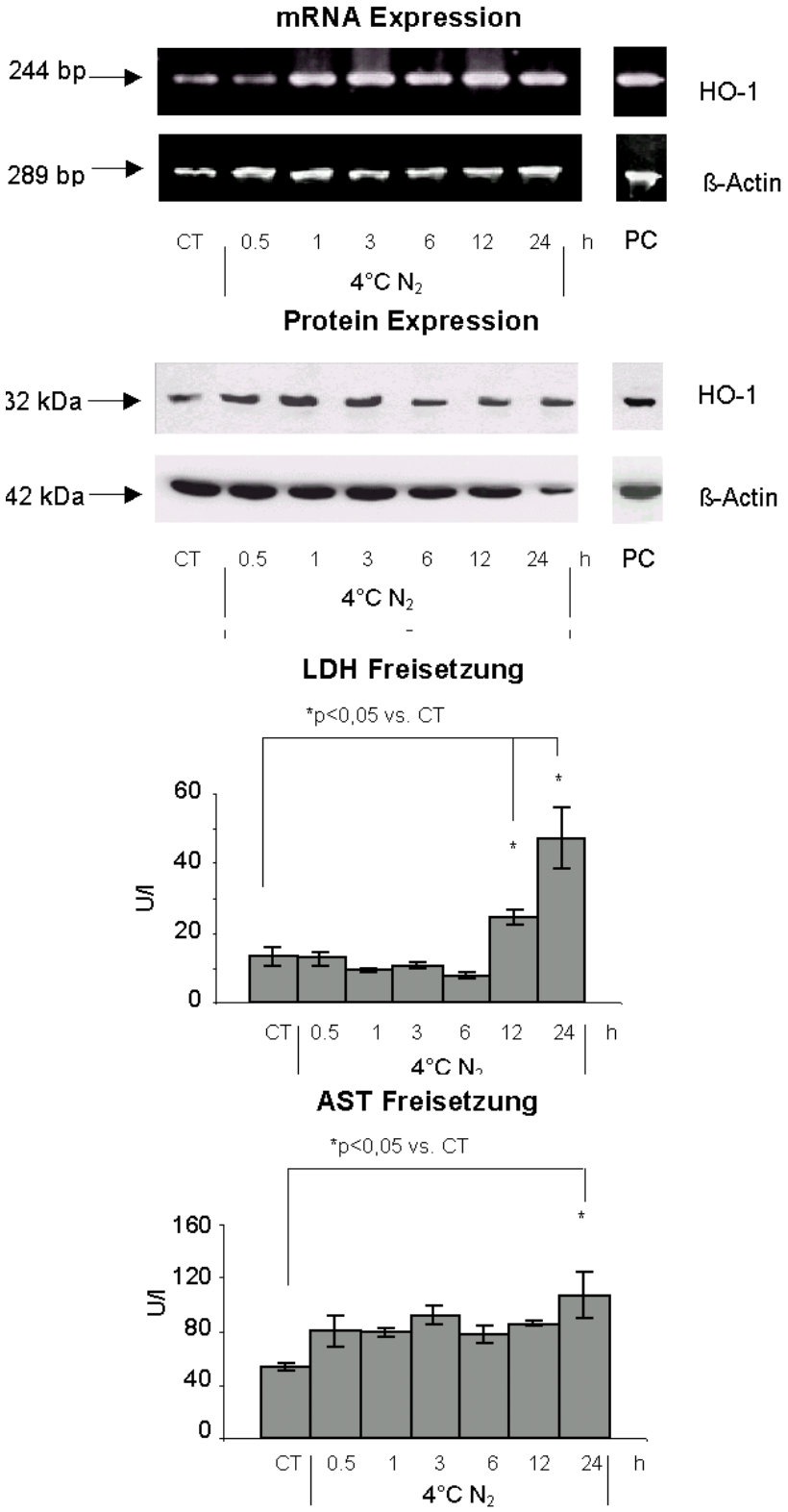


Abb. 7: Zeitabhängige Expression der HO-1 mRNA (oben) und des Proteins (mitte) sowie der LDH und AST Freisetzungen (unten) nach **kalter** Ischämie über 24 h. (Signifikanter Unterschied gegenüber CT *p<0,05)

4.3 De novo Synthese der HO-1 mRNA und des Proteins bei warmer und kalter Ischämie

Warme und kalte Ischämie führten nach 0,5 h bzw. 1 h zu einem Anstieg der HO-1 mRNA- und Proteinsynthese. Daß es sich hierbei um eine Neusynthese des Enzyms handelte und nicht um die Aktivierung bereits intrazellulär vorhandener mRNA bzw. Proteine, konnte durch die Blockade der mRNA Synthese mittels Actinomycin D sowie die Blockade der Proteinsynthese nach Cycloheximidgabe bewiesen werden (Abb. 8).

4.4 Anstieg der HO-1 Aktivität während einer Entzündungsreaktion sowie unter warmer und kalter Ischämie

Eine Entzündungsreaktion sowie warme und kalte Ischämie über 4 h steigerten die HO-1 Aktivität im Vergleich zur basalen HO-1 Aktivität der Kontrollgruppe. Die höchste Aktivität wurde bei der warmen Ischämie (18.9 pmol Bilirubin/ mg Protein/ min) beobachtet, gefolgt von der kalten Ischämie und der Induktion durch inflammatorische Zytokine (Abb. 9).

Die Eisen-II-Konzentration im Zytosol von Hepatozyten nach warmer Ischämie stieg von der Ausgangskonzentration in der Kontrollgruppe (41.7±16.2 µmol/ mg Protein) langsam an und erreichte ihr Maximum nach 12 h (155.1±51,7 µmol/ mg Protein)

Die Eisen-II-Konzentrationen der Hepatozyten nach kalter Ischämie änderten sich nicht signifikant (Abb. 9).

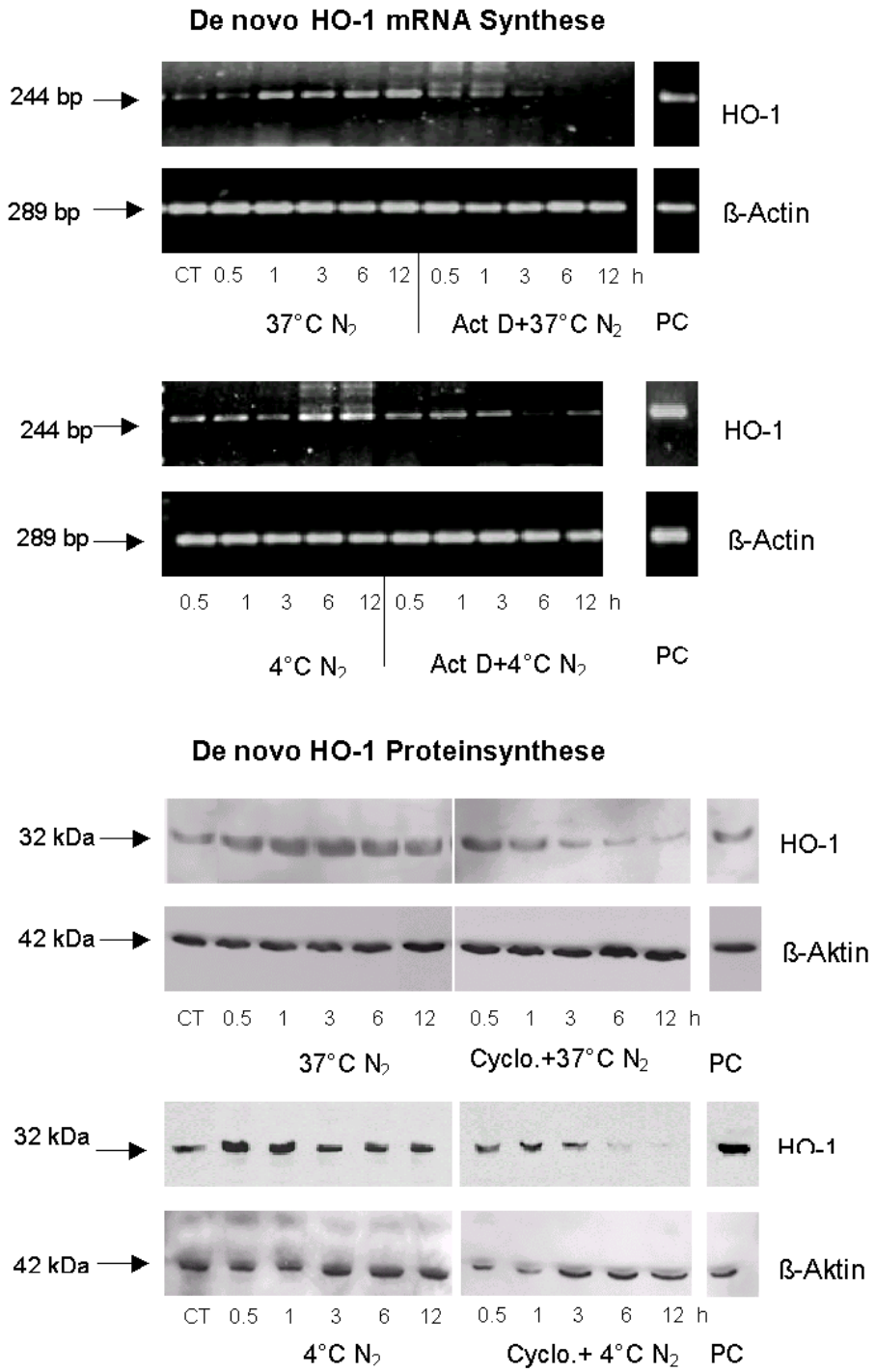


Abb. 8: Induktion der Neusynthese der HO-1 mRNA (oben links) und des HO-1 Proteins (unten links) während warmer (37°C N_2) und kalter (4°C N_2) Ischämie an humanen Hepatozyten, Blockade der mRNA Synthese mit Actinomycin D (oben rechts) und der Proteinsynthese mit Cycloheximid (unten rechts) während warmer und kalter Ischämie.

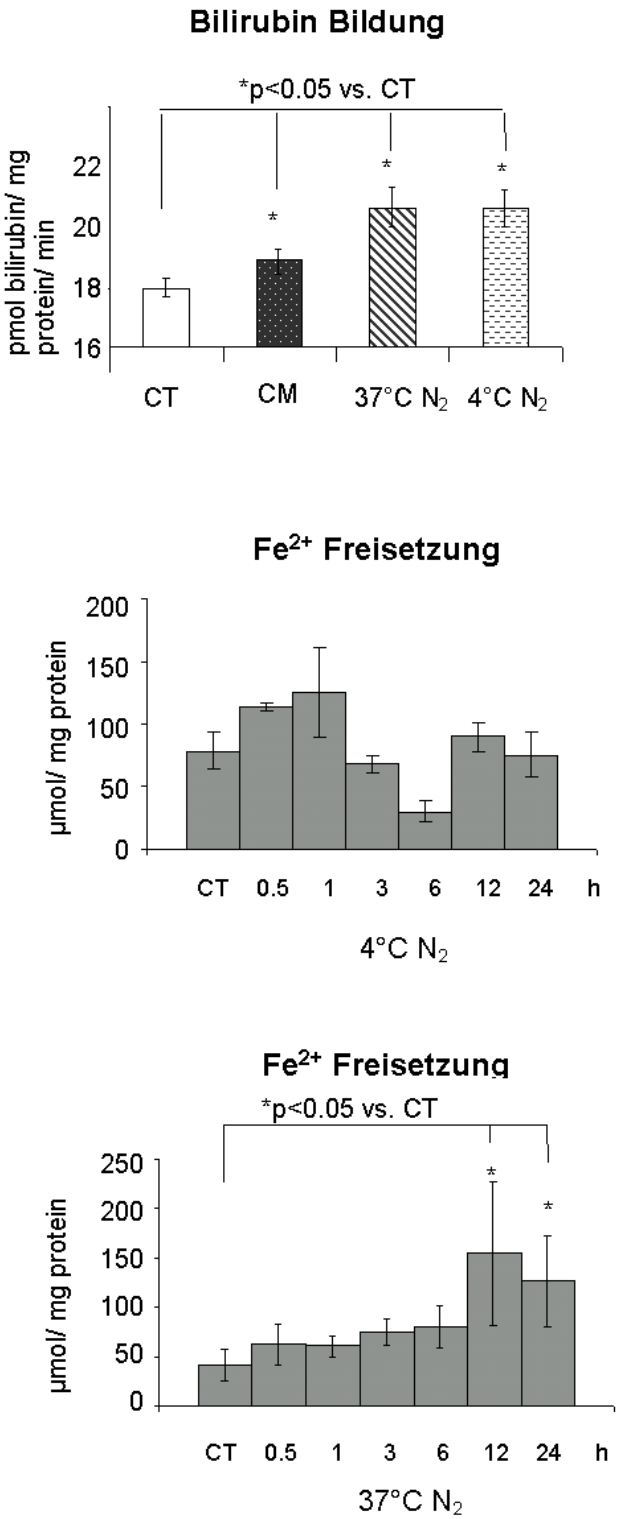


Abb. 9: HO-1 Aktivität: Bildung der durch HO-1 katalysierten Reaktionsprodukte, Bilirubin und Eisen-II nach Zytokinmix (CM, oben) und nach kalter (4°C N_2) und warmer Ischämie (37°C N_2, oben und unten) (Signifikanter Unterschied gegenüber CT *p<0,05).

4.5 Der Einfluß von H_2O_2 auf die Expression der HO-1 mRNA, des HO-1 Proteins sowie auf die zelluläre Schädigung

Hepatozyten wurden 6 h lang mit unterschiedlichen Konzentrationen von H_2O_2 (100-1000 µM) behandelt. Dabei konnte ab einer Konzentration von 500 µM H_2O_2 ein Anstieg der HO-1 mRNA Expression beobachtet werden. Ein Anstieg der HO-1 Proteinexpression konnte parallel zu mRNA Expression ab einer Konzentration von 500 µM H_2O_2 nachgewiesen werden. Die Behandlung mit H_2O_2 über 6 h bewirkte einen signifikanten Anstieg der LDH Freisetzung gegenüber der Kontrollgruppe. Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied in der AST Freisetzung im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (Abb. 10).

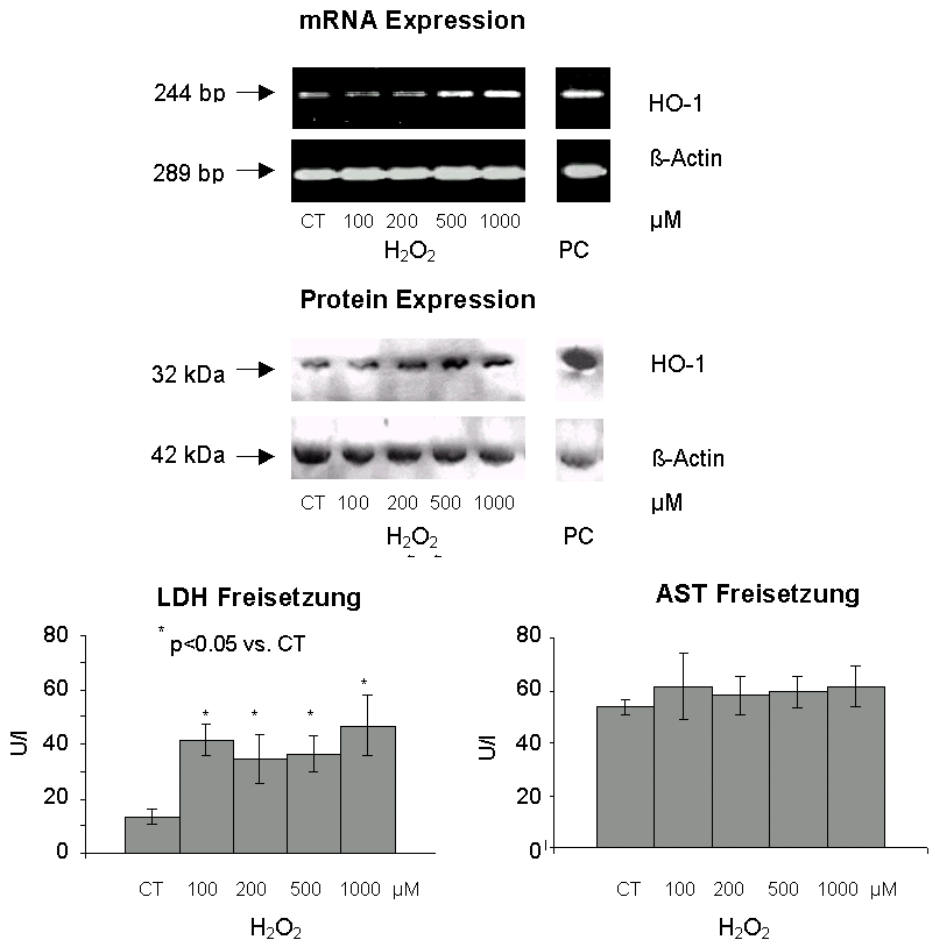


Abb. 10: Die Expression der HO-1 mRNA (oben), des HO-1 Proteins (mitte) und LDH und AST Freisetzungen (unten) nach H_2O_2 Exposition in aufsteigenden Konzentrationen über 6 h. (Signifikanter Unterschied gegenüber CT *p<0,05)

4.6 Der Einfluß von SNAP auf die Expression der HO-1 mRNA und des HO-1 Proteins sowie auf die zelluläre Schädigung

SNAP (0.5 mM) induzierte einen Anstieg der HO-1 mRNA Expression nach 3 h, der bis zu 12 h anhielt. Gleichzeitig war ein Anstieg des HO-1 Proteins nach 3 h mit einem Maximum nach 6 bis 12 h nachweisbar. Im Verlauf war ein langsamer aber nicht signifikanter Anstieg der AST Aktivität über 24 h (65,3±6,4 U/l vs. 53,5±2,5 U/l Kontrollgruppe) zu beobachten. Die LDH Aktivität unterschied sich jedoch nicht signifikant (Abb. 11).

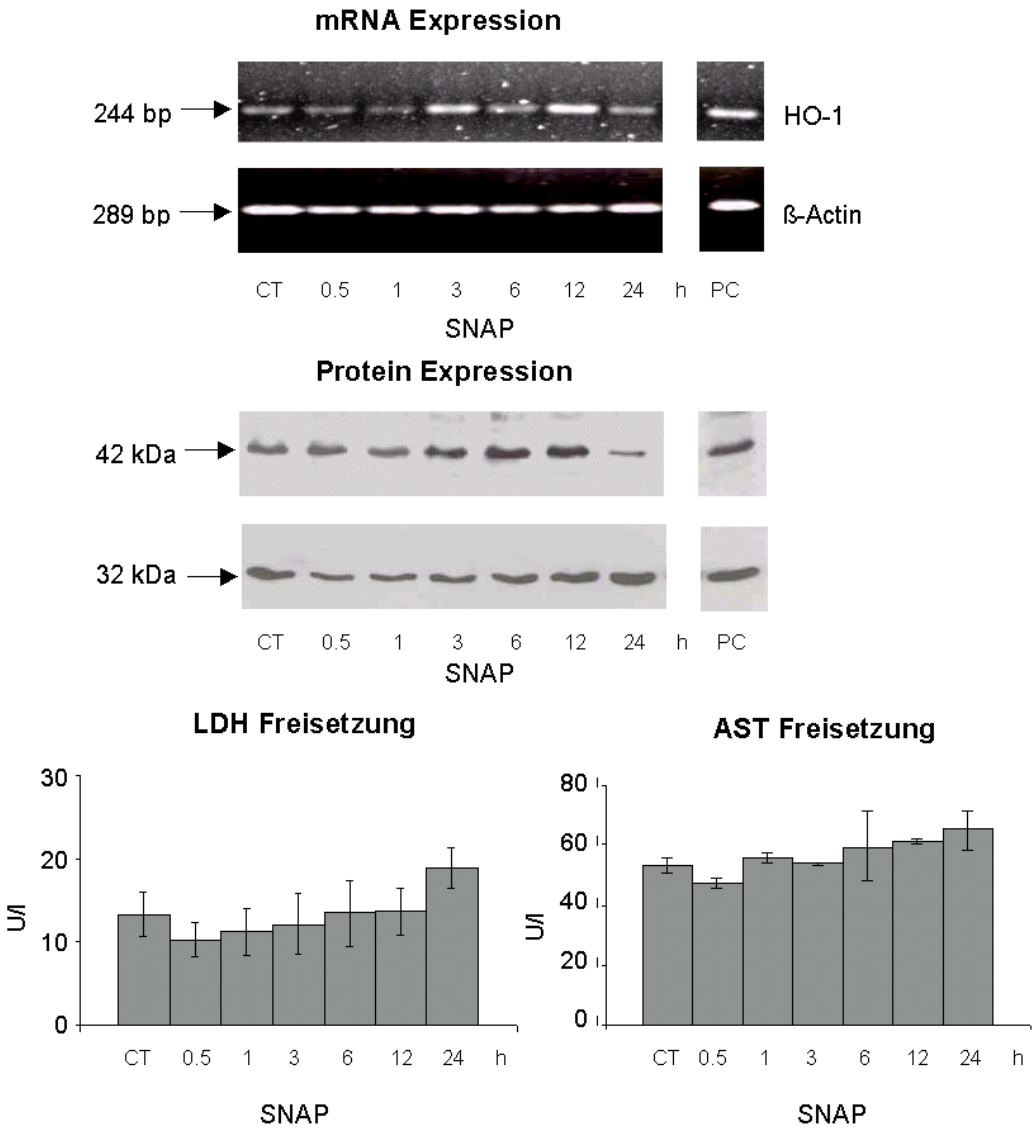


Abb. 11: Die Expression der HO-1 mRNA (oben), des HO-1 Proteins (mitte) und LDH und AST Freisetzungen (unten) nach SNAP Exposition über 24 h (Signifikanter Unterschied gegenüber CT *p<0,05).

4.7 Der pharmakologischer Einfluß von CoPP und Hemin auf die Expression der HO-1 mRNA, des HO-1 Proteins und auf die zelluläre Schädigung

4.7.1 CoPP Exposition

Die CoPP (10 µM) induzierte HO-1 mRNA Synthese setzte bereits nach 1 h ein. Das Expressionsmaximum wurde zwischen 3 h und 12 h erreicht. Die Induktion der HO-1 mRNA Synthese durch CoPP konnte in der gleichen Versuchsreihe durch Prästimulation mit Actinomycin D blockiert werden. Die HO-1 Proteinexpression nach der CoPP Stimulation war erst mit einer Verzögerung von 3 h nachweisbar und nahm nach 12 h an Intensität zu. Auch hier wurde die CoPP-induzierte Neusynthese des Proteins durch Prästimulation der Hepatozyten mit Cycloheximid vollständig gehemmt. Durch die Hemmung der mRNA Synthese mit Actinomycin D und der Proteinbiosynthese mit Cycloheximid konnte der Nachweis für die *de novo* mRNA und Proteinsynthese der HO-1 erbracht werden. Die LDH und AST Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant in diesen Gruppen. Eine Zellschädigung durch CoPP wurde nicht beobachtet (Abb. 12).

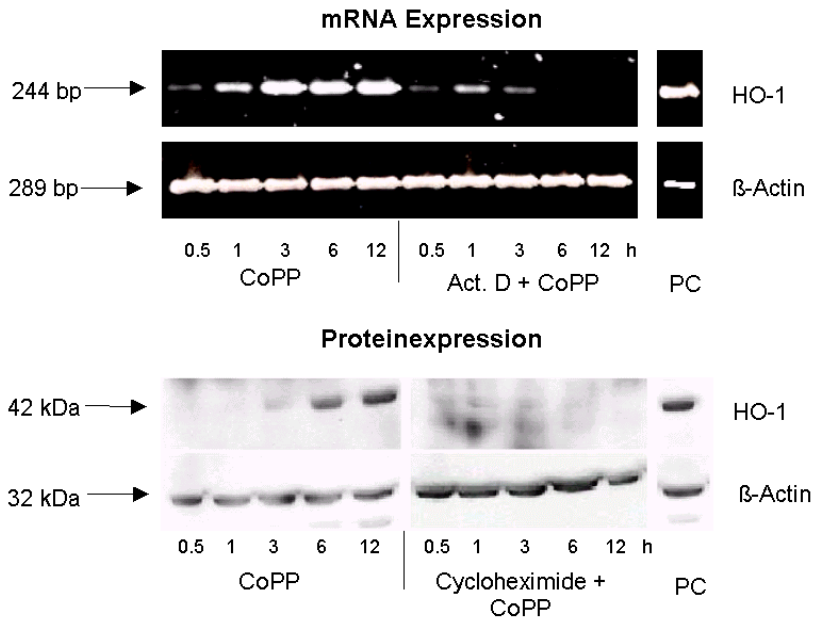


Abb. 12: Nachweis der Neusynthese der HO-1 mRNA (oben links) und des HO-1 Proteins (unten links) durch CoPP an humanen Hepatozyten, sowie deren Blockade mit Actinomycin D (oben rechts) und Cycloheximid (unten rechts).

4.7.2 Hemin Exposition

Hemin, ein bekanntes Substrat der HO-1, bewirkte ebenfalls einen Anstieg der HO-1 mRNA Synthese nach 3 h bis zu 12 h. Nach 24 h war das Ausgangsniveau wieder erreicht. Die HO-1 Proteinsynthese setzte erst nach 6 h ein und erreichte das Maximum nach 24 h. Die LDH Freisetzungen der kultivierten Hepatozyten unterschieden sich erst 24 h nach Hemin Exposition signifikant von der Kontrollgruppe. Die AST Konzentrationen unterschieden sich bei 6-24 h jedoch nicht signifikant. Um die Enzymaktivität der HO-1 einzuschätzen, wurde die Bildung von Fe^{2+} aus dem Fe^{3+} haltigen Hemin gemessen. Der Fe^{2+} Gehalt nahm bis zu 3 h zu (111.4±18.8 µmol/ mg vs. 49.1±23.5 µmol/ mg Protein Protein Kontrollgruppe) und fiel danach auf das Ausgangsniveau zurück (Abb. 14).

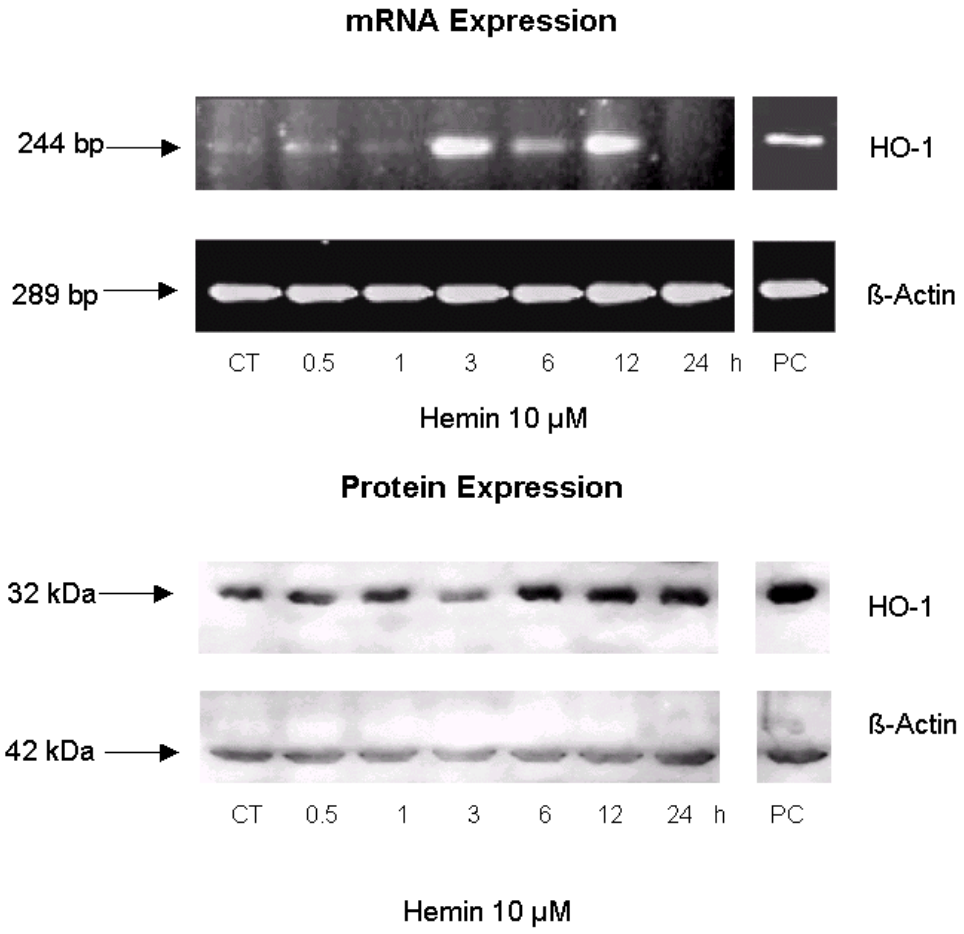


Abb. 13: Die Expression der HO-1 mRNA (oben), des HO-1 Proteins (unten) nach Heminexposition über 24 h.

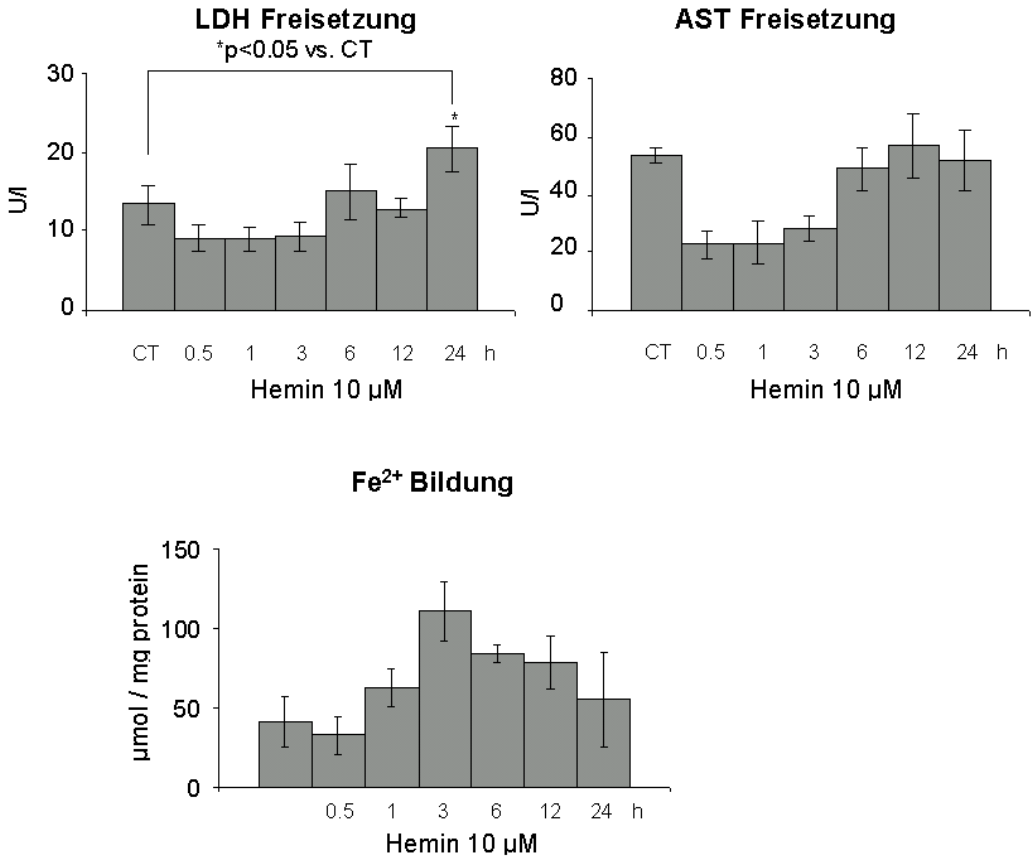


Abb. 14: Die LDH, AST, Eisen-II Freisetzungen nach Heminexposition über 24 h (Signifikanter Unterschied gegenüber CT *p<0,05).

4.8 Pharmakologische Prästimulation der HO-1 zur Protektion des ischämischen Zellschadens

Die warme und kalte Ischämie führen zu einer signifikanten Zellschädigung. Die HO-1 kann durch CoPP und Hemin pharmakologisch induziert werden, ohne daß eine signifikante Zellschädigung auftritt. Um die HO-1 zum Zeitpunkt des Eintretens des ischämischen Zellschadens bereits aktiviert zu haben, wurden die Hepatozyten vor der warmen und kalten Ischämie in einer Serie mit CoPP und in einer weiteren mit Hemin für 9 h stimuliert. 1 µM und 50 µM CoPP zeigte einen protektiven Effekt nach 24 h warmer und kalter Ischämie bedingter Zellschädigung gemessen als LDH und AST Freisetzung (Abb. 15). Im Gegensatz dazu konnte nach Heminprästimulation ein protektiver Effekt nur bei warmer Ischämie beobachtet werden (Abb. 16).

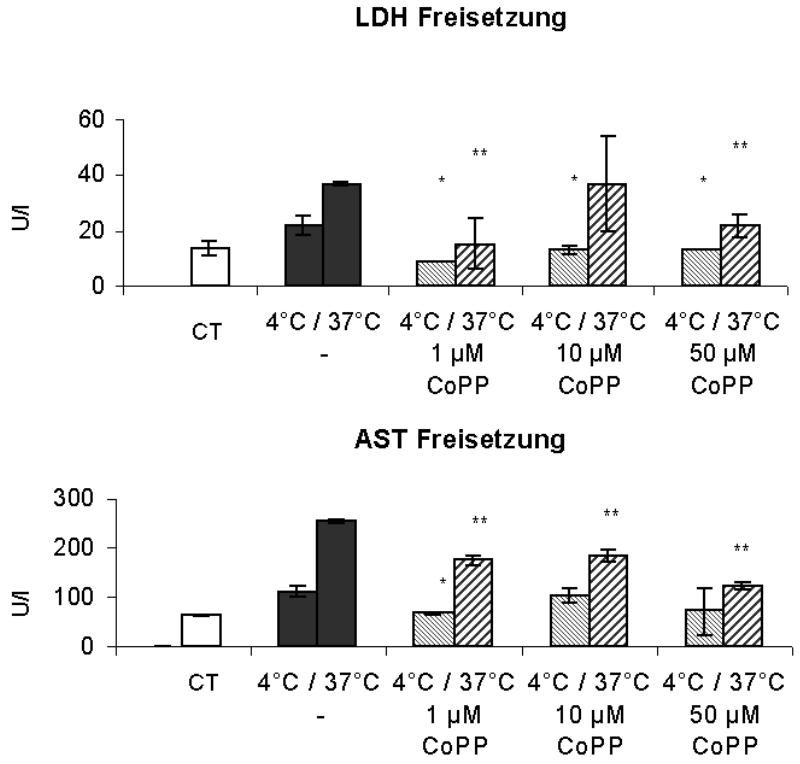


Abb. 15: Dosis-Wirkungsbeziehung: LDH und AST Freisetzungen nach 9 h Prästimulation mit CoPP in verschiedenen Konzentrationen mit anschliessender 24 h warmer und kalter Ischämie.(signifikanter Unterschied in der Enzymfreisetzung zwischen prästimulierten und nichtprästimulierten Gruppen (schwarze Balken): * Signifikanz $p<0,05$ bei der kalten Ischämie, ** Signifikanz $p<0,05$ bei der warmen Ischämie)

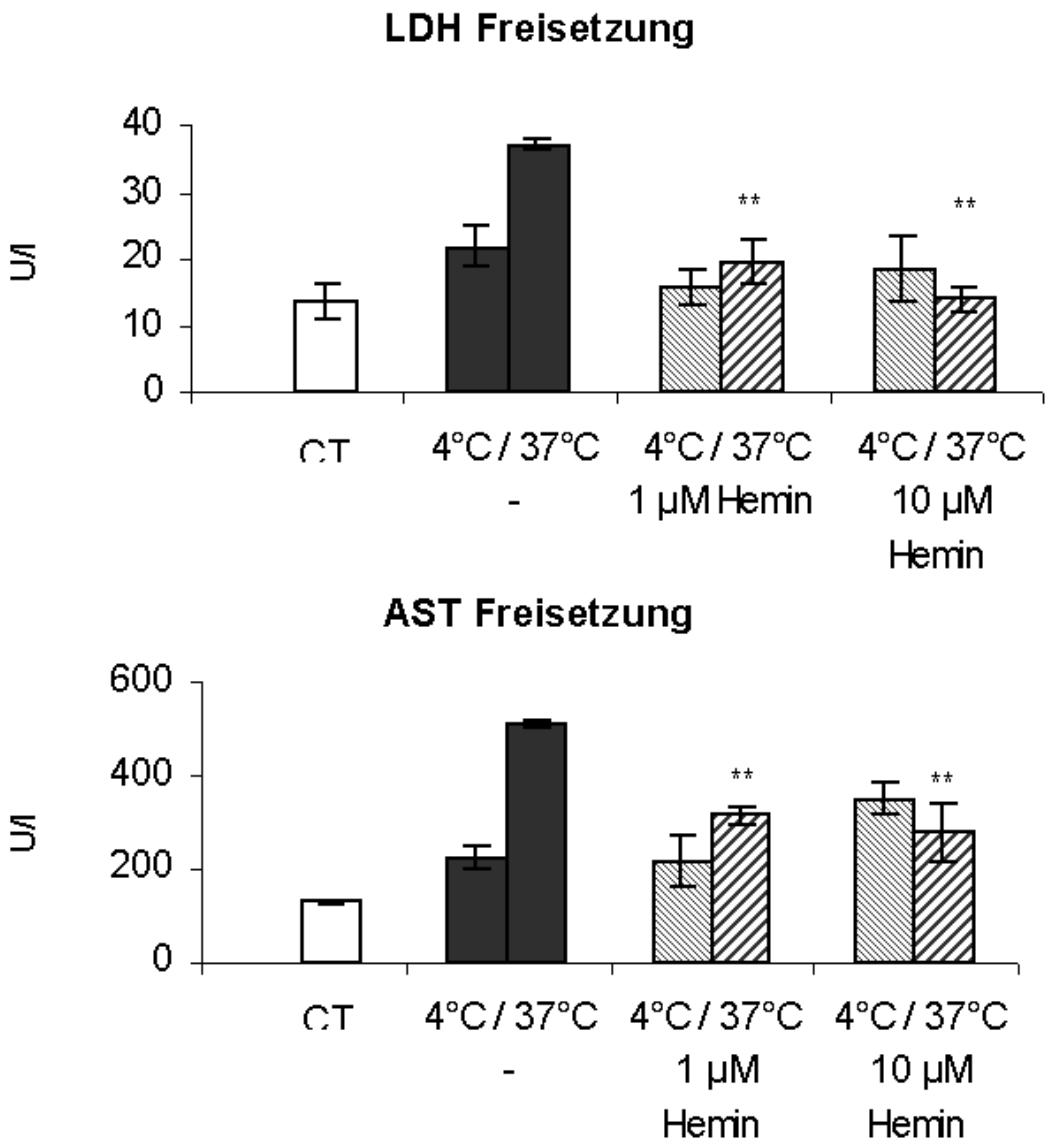


Abb. 16: LDH und AST Freisetzungen nach 9 h Prästimulation mit Hemin in verschiedenen Konzentrationen und anschliessender 24 h warmer und kalter Ischämie. (signifikanter Unterschied $p<0,05$ in der Enzymfreisetzung zwischen prästimulierten und nichtprästimulierten Gruppen (schwarze Balken): ** Signifikanz $p< 0,05$ bei der warmen Ischämie)

4.9 HO-1 Aktivität unter inflammatorischen und ischämischen Bedingungen

In diesem Experiment wurde untersucht, ob die HO-1 mRNA- und Proteinexpression mit der HO-1 Aktivität unter verschiedenen inflammatorischen und ischämischen Bedingungen korreliert ist. Die HO-1 Aktivität, bestimmt durch Bilirubinmessung, war nach Exposition der Zellen mit warmer, kalter Ischämie und CM über 4 h verglichen mit der Aktivität in der Kontrollgruppe bei allen Versuchsgruppen erhöht (Abb. 17).

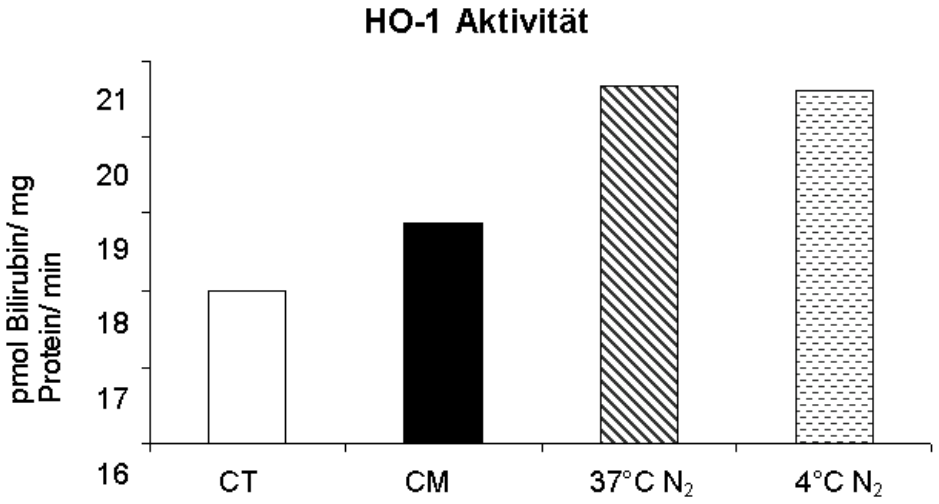


Abb. 17: HO-1 Aktivität nach 4 h Stimulation von warmer und kalter Ischämie sowie Zytokinmix (CM)

5 Diskussion

Die Unterbrechung der Blutzirkulation in einem Gewebe führt neben der ischämischen auch zu einer akuten inflammatorischen Reaktion, die eine signifikante Organfunktionsstörung hervorrufen kann [63]. Sie initiiert eine komplexe Kaskade, die eine weitere Schädigung in verschiedenen Organen, w.z.B. in der Leber, in den Lungen und den Nieren, bewirkt [93]. Die Reaktionen der Zellen auf diese Schädigungsmuster werden gegenwärtig intensiv untersucht, wobei verschiedene Schutzmechanismen zur Zeit diskutiert werden [83, 118]. Dazu gehört eine Familie von Proteinen, die als Stress- oder Hitzeschockproteine (HSP) bezeichnet wird [55]. Es sind viele Studien über die Regulations- und Schutzmechanismen dieser HSP Familie an unterschiedlichen in vivo sowie in vitro Modellen durchgeführt worden [31, 45, 90]. In primären humanen Hepatozytenkulturen sind bisher keine Untersuchungen veröffentlicht worden. Primäre humane Hepatozytenkulturen können verwendet werden, um die in vivo Mechanismen der HSP Regulation besser zu studieren. In der vorliegenden Studie wurden die Induktion und Regulation der HO-1, einem Vertreter der Familie der Hitzeschockproteine, unter verschiedenen Stressbedingungen w.z.B. die Inflammation, warme und kalte Ischämie und die Exposition mit verschiedenen Radikalspezies untersucht. Außerdem wurden Möglichkeiten der Prästimulation des HO-1 Gens getestet, um die Zellen vor den o.g. stressbedingten Zellschädigungen zu schützen.

5.1 Entzündungsmodelle

Da Zytokine und Endotoxin zu den Hauptfaktoren der septischen und inflammatorischen Reaktionskaskade gehören, wurden in der vorliegenden Studie zuerst deren Effekte auf die HO-1 Expression in humanen Hepatozyten untersucht. Die Inkubation der Zellen mit den Zytokinen (IL-1, IFN-γ, TNF-α) und Endotoxin (LPS) sowie deren Kombinationen führten nach einer halben bis zu 3 h zu einer gesteigerten Expression der HO-1 mRNA. Ein Abfall der HO-1 mRNA erfolgte nach 6 h. Ähnliche Verhältnisse konnten an unterschiedlichen Tiermodellen beobachtet werden. An der Leber der Maus wurde nach Zytokin- (IL-1β und TNF) und LPS-Stimulation in vivo die Induktion der HO-1 mRNA nach 2 h beschrieben. Dieses Expressionsniveau war wie in unserem Experiment in humanen Hepatozyten bis zu 6 h vergleichbar und sank danach ab [96]. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnte jedoch eine Induktion der mRNA durch IFN-γ nicht nachgewiesen werden [96]. In einer Studie an humanen

Endothelzellen wurde nach Exposition mit IL-1β und TNF-α eine Steigerung der HO-1 mRNA Expression beschrieben, die ihr Maximum nach 4 h erreichte und nach 6 h wieder absank [112]. In anderen Zellkulturmodellen oder Geweben, w.z.B. Pankreasinselzellen der Ratte [120], und in der Lunge der Ratte [16, 18], wurde die HO-1 mRNA durch die Gabe verschiedener Zytokine oder LPS nach unterschiedlichen Zeiten zwischen 4 und 12 h induziert. Die Induktion der HO-1 Proteinexpression in humanen Hepatozyten verlief parallel zur mRNA Expression zwischen 0,5 und 1 h. Nach Stimulation mit IFN-γ wurde die höchste Proteinexpressionsrate beobachtet, gefolgt von LPS, TNF-α und IL-1β. Während die Expression des Proteins bei der Einzelzytokinstimulation nach 3 h wieder sank, erreichte sie bei kombinierter Stimulation (CM) erst nach 6 h ihr Maximum. Unsere Ergebnisse unterscheiden sich von anderen Studien, bei denen die Expression erst nach längeren Inkubationszeiten beobachtet wurde [93, 112]. An humanen Endothelzellen wurde z. B. durch IL-1α und TNF-α eine maximale Proteinexpression nach 6 h gemessen, auf die ein Abfall folgte [112], während in murinen Makrophagen ein Anstieg der HO-1 Proteinexpression nach 24 h LPS Exposition beobachtet wurde [93]. In der vorliegenden Studie waren nach der Exposition der Hepatozyten mit den Einzelzytokinen und LPS oder deren Kombinationen keine signifikanten Unterschiede in den LDH- und AST-Aktivitäten im Vergleich zur Kontrollgruppe messbar. Inkubation der humanen Hepatozyten mit allen Zytokinen plus LPS führte nach 12 h zu einer signifikanten Zellschädigung.

5.2 Modelle der warmen und kalten Ischämie

Die klinische Organkonservierung für die Transplantation erfolgt bei 2-4°C [94]. Der Zeitraum zwischen der Organexplantation, des Transportes und der Implantation beträgt in der Regel 5 bis 24 h [94]. Dabei unterliegt das Organ sowohl hypothermen als auch ischämischen Einflüssen, die zu einer Gewebeschädigung beitragen [91, 95]. Im Gegensatz dazu treten während der Leberoperation Ischämien unter normothermen Bedingungen auf. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde beobachtet, dass unmittelbar nach Beginn (0,5 h bis 1 h) der warmen und kalten Ischämie in humanen Hepatozytenkulturen die HO-1 mRNA exprimiert wurde. Gleichzeitig konnte ein Anstieg der HO-1 Proteinexpression über den gesamten Zeitraum nachgewiesen werden. Der Einfluss hypoxischer Bedingungen (7% O_2) für 0-2 h auf die HO-1 mRNA Expression wurde bereits an verschiedenen Geweben der Ratte untersucht [62].

Ein Anstieg der HO-1 mRNA Expression wurde dabei an der Lunge, der Leber, am Herzen und an der Aorta nach 30 bis zu 60 min der Ischämie nachgewiesen. Die Leber und die Lunge waren die Organe mit der höchsten Induktionsrate. Die Induktion der HO-1 mRNA in der glatten Gefässmuskulatur wurde erst nach 4 h Exposition unter hypoxischen Bedingungen (1% O_2) beschrieben. Das Maximum wurde nach 8 h erreicht und fiel nach 24 bis 48 h wieder ab. Die HO-1 Proteinexpression in diesen Zellen war nach 24 h Hypoxie ebenfalls höher als in der Kontrollgruppe [62]. In bovinen Endothelzellen der Aorta wurde auch ein Anstieg der HO-1 Aktivität, mRNA und Proteinexpression nach Hypoxie beobachtet [82, 98]. Diese Ergebnisse zeigen, ähnlich der vorliegenden Studie, dass Hypoxie zu einem zeitabhängigen Anstieg der HO-1 mRNA- und Proteinexpression führt. Der Zeitraum bis zum Anstieg und die Dauer der Expression der HO-1 mRNA und des Proteins gegenüber der Hypoxie sind in den verschiedenen Zelltypen und Geweben jedoch unterschiedlich. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass warme und kalte Ischämie zu einer Schädigung der zellulären Integrität führt. Das Ausmaß der Ischämie-bedingten Zellschädigung wurde durch die AST- und LDH-Freisetzung aus den Zellen verifiziert. Während die AST Freisetzung über den gesamten Zeitraum der warmen als auch der kalten Ischämie kontinuierlich anstieg, wurde ein signifikanter Anstieg der LDH Freisetzung erst nach 6 bis 12 h beobachtet. Ein ähnlicher Verlauf war nach Hypothermie und Hypoxie an Rattenhepatozyten ebenfalls beschrieben worden, um das Auftreten der Apoptose zu untersuchen [94]. Dieser Verlauf wurde als kälteinduzierter Konservierungsschaden der Zellen interpretiert [94]. Die Änderung des intrazellulären Fe^{2+} Gehaltes könnte mit der HO-1 Aktivität, d.h. des Abbaus des Häms erklärt werden [67]. Der Fe^{2+} Gehalt der humanen Hepatozyten stieg nach warmer Ischämie bis zu 12 h langsam an. Bei der kalten Ischämie wurde ein Maximum nach 1 h und ein Abfall unter das Ausgangsniveau nach 6 h beobachtet. Die Reduktion der Fe^{2+} Konzentration unter das Ausgangsniveau könnte durch die Bindung an Ferritin erklärt werden. Es wird auch diskutiert, dass die HO-1 assozierte Eisenfreisetzung die intrazelluläre Ferritinsynthese moduliert [30, 37, 121].

5.3 Wirkung von S- nitrosoacetylpenicillamin (SNAP) als NO-Derivat und H_2O_2 als reaktiver Sauerstoffmetabolit

Reaktive Sauerstoffmetabolite (ROI) und Stickstoffmonoxid (NO) spielen im Verlauf von vielen Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle [51, 100].

5.3.1 Wirkung von SNAP

In der vorliegenden Studie wurde die Induktion der HO-1 mRNA und Proteinexpression nach der Exposition mit SNAP für 3-12 h beobachtet. Nach 24 h folgte ein Abfall dieser Expression. Eine signifikante Zellschädigung wurde dabei nicht festgestellt. In einer Studie an Endothelzellen wurde nach SNAP Exposition ein 5 bis 9-facher Anstieg der HO-1 mRNA Expression über einen Zeitraum von 4-10 h beobachtet. Nach 24 h fiel die Expressionsrate wieder auf das Ausgangsniveau zurück [121]. Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde in renalen Tubulusepithelzellen ein direkter dosisabhängiger Anstieg der HO-1 Aktivität durch SNAP (0.1-1 µM) beschrieben [64]. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass SNAP, ein NO-Donor, die HO-1 induzieren kann. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe über ein [27] und scheint beim Menschen nicht unterschiedlich von anderen Spezies zu sein.

5.3.2 Wirkung von H2O2

Um oxidativen Stress zu simulieren, wurden Hepatozyten mit H_2O_2, einem Sauerstoffderivat behandelt. HO-1 mRNA- und Proteinexpressionen wurden nach 6 stündiger Inkubation mit H_2O_2 (100-1000 µM) induziert. Ein signifikanter Zellschaden konnte nicht nachgewiesen werden, obgleich eine relativ hohe Konzentration benutzt wurde. Die Induktion der HO-1 mRNA wurde ebenfalls in humanen Hautfibroblasten beschrieben [27]. So wurde auch gezeigt, dass H_2O_2 die HO-1 mRNA in anderen Säugetierzelllinien induziert [109]. H_2O_2 bewirkte in Rattenhepatozyten nach 15-30 minütiger Inkubation keine zytotoxischen Effekte, während nach 1-24 h Inkubation die Hepatozyten eine dosisabhängige Schädigung aufwiesen (10-1000 µM) [41]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass H_2O_2 die HO-1 mRNA und Protein in humanen Hepatozyten ohne nachweisbare Zellschäden induziert.

5.4 Pharmakologische Induktion der HO-1

Cobalt gehört zu den potenten Induktoren der HO-1 [71]. In der vorliegenden Studie induzierte CoPP den Anstieg der HO-1 mRNA und Proteinexpression. Es wurde keine signifikante Zellschädigung durch LDH und AST Freisetzung gemessen. Dass es sich hierbei um eine Neusynthese der mRNA und des Proteins handelt, konnte durch die selektive Blockade der mRNA Synthese mit Actinomycin D und der Proteinsynthese mit Cycloheximid bewiesen werden. $CoCl_2$ und CoPP induzierten die HO-1 Aktivität und $CoCl_2$ ebenfalls die Proteinexpression in Pankreasinselzellen [120]. In in vivo Experimenten der Maus wurde durch CoPP-Injektion ein Anstieg der HO-1 Proteinexpression nach 24 h in der Milz, in der Leber und in der Niere nachgewiesen [118]. Da die HO-1 durch CoPP mit einer Latenz induziert wurde, könnten auch andere Mechanismen bei diesem Effekt eine Rolle spielen [27]. So könnte CoPP über die Verschiebung des oxidativen Gleichgewichtes durch Reduktion der intrazellulären GSH Konzentration mit konsekutivem Anstieg der freien Peroxidkonzentration die HO-1 mRNA Expression induzieren [27]. Während einer leichten Induktion der HO-1 protektive Effekte zugerechnet werden, kann eine starke Induktion durch CoPP auch toxisch wirken [27]. Hemin, ein anderer Induktor der HO-1 Synthese, stimulierte in der vorliegenden Studie die HO-1 mRNA Expression nach 3 h und die Proteinexpression nach 6 h. Es war jedoch nach 24 h nicht mehr nachweisbar. Eine ähnliche Wirkung auf die HO-1 mRNA und Aktivität wurde an humanen Makrophagen und an humanen sowie an Rattengliomzellen beschrieben [122]. Dass Häm (10-20 µM) die HO-1 mRNA induzieren kann, wurde erst vor kurzem an Primärkulturen von Hepatozyten von Hühnerembryonen nach einer Expositionsdauer von 5-8 h gezeigt [15, 106]. Ähnlich zu der vorliegenden Studie, folgte ebenfalls ein Abfall der mRNA Expressionsrate nach 15 h [106]. Ein Anstieg des HO-1 Proteins wurde ebenfalls beobachtet [106]. An humanen Epithelzellen der Trachea bewirkte die Heminexposition eine maximale Expression der mRNA und des Proteins nach 8 h, die mit einem Anstieg der HO-1 Aktivität verbunden war [119]. An ko-kultuvierten humanen Endothel- und glatten Muskelzellen der Aorta war ebenfalls eine durch Häm stimulierbare HO-1 mRNA und Aktivität gefunden worden [46]. In diesen Studien konnte man von einem protektiven Effekt des Hemins durch Vorbehandlung der Zellen gegenüber verschiedenen Zellschädigungsmechanismen ausgehen [46, 87, 119]. In der hier vorliegenden Studie wurden erhöhte LDH und AST Konzentrationen gemessen, so dass

toxische Effekte nicht auszuschliessen sind, ähnlich wie es an glatten Muskelzellen berichtet wurde [75].

5.5 Der Einfluß der Vorbehandlung von HO-1 Induktoren auf die ischämische Zellschädigung

Um die HO-1 wegen ihrer potentiell antioxidativen Wirkung zum Zeitpunkt des Eintretens des ischämischen Zellschadens bereits aktiviert zu haben, wurden humane Hepatozyten vor der warmen und kalten Ischämie mit verschiedenen Konzentrationen von CoPP 9 h vorstimuliert. Dabei wurde ein protektiver Effekt beobachtet. Der Einfluß der CoPP induzierten HO-1 Expression auf die zell-mediierte Immunreaktion wurde an Mäusen bereits untersucht [118]. Unter anderem wurde eine ausgeprägte Suppression der Aktivität von T-Zellen und zytotoxischen Killerzellen beschrieben [118]. In vivo verlängerte CoPP das Überleben allogener, heterotoper Herztransplantate bei der Maus [118]. Die Hochregulation der HO-1 durch CoPP in der adipösen Zucker-Rattenleber hat zu einem Schutz vor dem kalten Ischämie-/ Reperfusionsschaden geführt [5]. Die AST Konzentrationen waren sowohl in der Reperfusionsphase als auch im weiteren Verlauf niedriger als in der Kontrollgruppe und mit einer höheren Überlebensrate der transplantierten Ratten verbunden. Dieser Effekt wurde auf die immunsupprimierende Wirkung von HO-1 zurückgeführt [5]. Nutter et al [86] hat dagegen in seinen Untersuchungen keinen protektiven Effekt an humanen Zellen nachweisen können. Dennoch kann man aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung ableiten, daß die Prästimulation der HO-1 zu einem gewissen Grad humane Hepatozyten gegenüber ischämischebedingter Zellschädigung bei 24 h schützen kann. In der vorliegenden Studie wurde die Prästimulation der HO-1 auch mit Hemin über 9 h erreicht. Eine ähnliche Wirkung auf die HO-1 Aktivität wurde an humanen Makrophagen und an humanen sowie an Rattengliomzellen beschrieben [122]. An humanen Epithelzellen der Trachea bewirkte die Heminexposition eine maximale Expression der mRNA und des Proteins nach 8 h, die mit einem Anstieg der HO-1 Aktivität verbunden war [119]. An ko-kultuvierten humanen Endothel- und glatten Muskelzellen der Aorta war ebenfalls eine durch Häm stimulierbare HO-1 mRNA und Aktivität gefunden worden [46].

5.6 HO-1 Aktivität unter inflammatorischen Bedingungen

Die HO-1 Aktivität, bestimmt durch Bilirubinmessung, war nach Exposition der Zellen mit warmer, kalter Ischämie und CM für 4 h verglichen mit der Aktivität in der Kontrollgruppe bei allen Versuchsgruppen erhöht. Sie war ebenfalls durch LPS und IFN-γ Exposition für 6 h an Endothelzellen des Schweins induzierbar [83]. In bovinen Endothelzellen der Aorta wurde ebenfalls ein Anstieg der HO-1 Aktivität nach Hypoxie von 10-24 h beobachtet [82, 98].

5.7 Zusammenfassende Bewertung

Die Unterschiede in der Induktion der HO-1 mRNA oder des Proteins in den verschiedenen Geweben in vivo oder in vitro können von den Bedingungen des Experimentes und der Zellkultur abhängen. In einigen hier durchgeführten Experimenten konnte eine hohe konstitutive HO-1 Expression nachgewiesen werden. Die HO-1 Synthese in Zellen könnte durch verschiedene Manipulationen während der Operation, w.z.B. beim Abklemmen der Gefäße, oder während der Zellgewinnung durch die oben beschriebene Perfusionstechnik aktiviert werden. In der vorliegenden Studie wurde die Induktion der HO-1 mRNA und des Proteins in verschiedenen Schädigungsmodellen beobachtet. Die warme und kalte Ischämie und die Enzündungsreaktion führen während der Leberoperationen und -transplantationen zu Gewebeschäden. Gleichzeitig wird ein hochkonserviertes zytoprotektives Enzymsystem, die HO-1, aktiviert. Es wurde gezeigt, dass dieses Enzymsystem eine protektive Rolle in humanen Hepatozyten durch eine pharmakologische Prästimulation, d.h. Aktivierung vor Einsetzen der Schädigung, spielen kann. Die pharmakologische Induktion der HO-1 Synthese und Aktivität könnte während der oben genannten ischämischen oder inflammatorischen Situationen von therapeutischer Bedeutung sein.

Literaturverzeichnis

1 Abacus Concepts, StatView Tutorial. (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, 1996)

2 Abraham NG, Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Stoltz RA, Levere RD, Gerritsen ME, Shibahara S, Kappas A. Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92(*15*):6798-802.

3 Agarwal A, Kim Y, Matas AJ, Alam J, Nath KA. Gas-generating systems in acute renal allograft rejection in the rat. Co-induction of heme oxygenase and nitric oxide synthase. Transplantation 1996;61(*1*):93-8.

4 Agarwal A, Nick HS. Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 Gene Ablation and expression. J Am Soc Nephrol 2000;11(*5*):965-73.

5 Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XY, Zhao D, Zaky J, Melinek J, Lassman CR, Kolls JK, Alam J, Ritter T,Volk HD, Farmer DG, Ghobrial RF, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. J Clin Invest 1999;104(*11*):1631-9.

6 Babbs CF, Salaris SC, Turek JJ. Cytochemical studies of hydrogen peroxide generation in postischemic hepatocytes. Am J Physiol 1991;260(*1Pt2*):H123-9.

7 Bandy B, Davison AJ. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging. Free Rad Biol Med 1990;8:523-39

8 Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K, Eaton JW, Vercellotti GM. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90(*20*):9285-9.

9 Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-□B--A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. N Engl J Med. 1997;336(*15*):1066-71

10 Bauer I, Vollmar B, Jaeschke H, Rensing H, Kraemer T, Larsen R, Bauer M. Transcriptional activation of heme oxygenase-1 and its functional significance

in acetaminophen-induced hepatitis and hepatocellular injury in the rat. J Hepatol 2000;33(*3*):395-406.

11 Bauer I, Wanner GA, Rensing H, Alte C, Miescher EA, Wolf B, Pannen BHJ, Clemens MG, Bauer M. Expression Pattern of Heme Oxygenase Isoenzymes 1 and 2 in Normal and Stress-Exposed Rat Liver. Hepatology 1998;27:829-838.

12 Baumann M, Bender E, Strommer G, Gross G, Brand K. Effects of warm and cold ischemia on mitochondrial functions in brain, liver, and kidney. Mol Cell Biochem 1989;87:137-145

13 Belinsky SA, Poop JA, Kaufman FC, Thurman RG.Trypan Blue uptake as a new method to study hepatotoxicity in the perfused liver. J Pharmacol Exp Ther 1984;230:755-760.

14 Bonkovsky HL, Ponka P, Bacon BR, Drysdale J, Grace ND, Tavill AS. An update on iron metabolism: summary of the Fifth International Conference on Disorders of Iron Metabolism. Hepatology 1996;24(*3*):718-29.

15 Cable E, Greene Y, Healey J, Evans CO, Bonkovsky H. Mechanism of synergistic induction of hepatic heme oxygenase by glutethimide and iron: studies in cultured chick embryo liver cells. Biochem Biophys Res Commun 1990;168(*1*):176-81.

16 Camhi SL, Alam J, Otterbein L, Sylvester SL, Choi A. Induction of heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation. Am J Respir Cell Mol Biol 1995; 13:387-98.

17 Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Bagnati M, Albano E. Ischemic preconditioning reduces Na(+) accumulation and cell killing in isolated rat hepatocytes exposed to hypoxia. Hepatology 2000;31(*1*):166-72.

18 Carraway MS, Ghio AJ, Taylor JL, Piantadosi CA. Induction of ferritin and heme oxygenase-1 by endotoxin in the lung. Am J Physiol 1998;275(*3Pt 1*):L583-92.

19 Choi AM, 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 1996;15(*1*):9-19.

20 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid

guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162:156-9.

21 Churchill TA, Cheetham KM, Fuller BJ. Glycolysis and energy metabolism in rat liver during warm and cold ischemia: evidence of an activation of the regulatory enzyme phosphofructokinase. Cryobiology 1994;31:441452

22 Clark JE, Foresti R, Green CJ, Motterlini R. Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. Biochem J 2000;348(*Pt 3*):615-9.

23 Clavien PA, Camargo CA Jr, Gorczynski R, Washington MK, Levy GA, Langer B, Greig PD. Acute reactant cytokines and neutrophil adhesion after warm ischemia in cirrhotic and noncirrhotic human livers. Hepatology 1996;23(*6*):1456-63.

24 Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. Transplantation 1992;53(*5*):957-78.

25 Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. Hepatology 1996;23(*3*):506-14.

26 Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL et al. Oxygen radicals and human disease. Ann Int Med 1987;107:526-45

27 Dennery PA. Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury. Current Topics in Cellular Regulation 2000;36:181-199.

28 Deramaudt TB, da Silva JL, Remy P, Kappas A, Abraham NG. Negative regulation of human heme oxygenase in microvessel endothelial cells by dexamethasone. Proc Soc Exp Biol Med 1999;222(*2*):185-93.

29 Dorko K, Freeswick PD, Bartolli F, Cicalese L, Bardsley BA, Tzakis A, Nussler AK. A new technique for isolating and culturing human hepatocytes from whole or split livers not used for transplantation. Cell Transplant 1994;3(*5*):387-95.

30 Eisenstein RS, Garcia-Mayol D, Pettingell W, Munro HN. Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. Proc Natl Acad Sci U S A 1991;88(*3*):688-92.

31 Elbirt KK, Bonkovsky HL. Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. Proc Assoc Am Physicians 1999;111(*5*):438-47.

32 Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. J Mol Med 1999;77(*8*):577-92.

33 Fernandez M, Bonkovsky HL. Increased heme oxygenase-1 gene expression in liver cells and splanchnic organs from portal hypertensive rats. Hepatology 1999;29(*6*):1672-9.

34 Flohe S, Speidel N, Flach R, Lange R, Erhard J, Schade FU. Expression of HSP 70 as a potential prognostic marker for acute rejection in human liver transplantation. Transpl Int 1998;11(*2*):89-94.

35 Fujita H. Molecular mechanism of heme biosynthesis. Tohoku J Exp Med 1997;183(*2*):83-99.

36 Furchgott RF, Jothianandan D. Endothelium-dependent and –independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. Blood Vessels 1991;28(*1-3*):52-61.

37 Greiling H, Gressner AM. Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. Kapitel Eisenstoffwechsel S. 168, S. 644. 2. Auflage, Schattauer Stuttgart, New York 1989, ISBN 3-7945-1304-5

38 Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, Kitajima M, Makino N, Ishimura Y, Suematsu M. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. Circ Res 1999;85(*8*):663-71.

39 Henningsson R, Alm P, Ekstrom P, Lundquist I. Heme oxygenase and carbon monoxide: regulatory roles in islet hormone release: a biochemical, immunohistochemical, and confocal microscopic study. Diabetes 1999;48(*1*):66-76.

40 Horvath I, Donnelly LE, Kiss A, Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress. Thorax 1998;53(8):668-72.

41 Imanishi H, Scales WE, Campbell DA Jr.Tumor necrosis factor alpha alters the cytotoxic effect of hydrogen peroxide in cultured hepatocytes. Biochem Biophys Res Commun 1997;230(*1*):120-4.

42 Immenschuh S, Hinke V, Ohlmann A, Gifhorn-Katz S, Katz N, Jungermann K, Kietzmann T. Transcriptional activation of the haem oxygenase-1 gene by cGMP via a cAMP response element/activator protein -1 element in primary cultures of rat hepatocytes. Biochem J 1998;334(*Pt1*):141-6.

43 Immenschuh S, Iwahara S, Satoh H, Nell C, Katz N, 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 1995;34(*41*):13407-11.

44 Immenschuh S, Nell C, Iwahara S, Katz N, Muller-Eberhard U. Gene regulation of HBP 23 by metalloporphyrins and protoporphyrin IX in liver and hepatocyte cultures. Biochem Biophys Res Commun 1997;231*(3*):667-70.

45 Immenschuh S, Ramadori G. Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. Biochem Pharmacol 2000;60(*8*):1121-8.

46 Ishikawa K, Navab M, Leitinger N, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL. J Clin Invest 1997;100(*5*):1209-16.

47 Ito K, Ozasa H, Sanada K, Horikawa S. Doxorubicin preconditioning: a protection against rat hepatic ischemia-reperfusion injury. Hepatology 2000;31(*2*):416-9.

48 Iu S, Harvey PRC, Makowka L, Petrunka CN, Ilson RG, Strasberg SM. Markers of allograft viability in the rat. Transplantation 1987;44:*562-569*

49 Jaeschke H. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. PSEBM 1995;209:104-11.

50 Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. J Hepatol 1996;25(*5*):774-80.

51 Janssen YMW, Van Houten B, Borm PJA, Mossman BT. Cell and tissue responses to oxidative damage. Lab Invest. 1993;69(*3*):261-74.

52 Juckett M, Zheng Y, Yuan H, Pastor T, Antholine W, Weber M, Vercellotti G. Heme and the endothelium. Effects of nitric oxide on catalytic iron and heme degradation by heme oxygenase. J Biol Chem 1998;273(*36*):23388-97.

53 Jung M, Drapier JC, Weidenbach H, Renia L, Oliveria L, Wang A, Beger HG, Nussler AK. Effects of hepatocellular iron imbalance on nitric oxide and reactive oxygen intermediates production in a model of sepsis. Hepatology 2000;33:387-394

54 Kaplowitz N. Mechanisms of liver cell injury. J Hepatol 2000;32(*1Suppl*):39-47.

55 Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. Pharmacol Ther 1998;80(*2*):183-201.

56 Kietzmann T, Immenschuh S, Katz N, Jungermann K, Muller-Eberhard U. Modulation of hemopexin gene expression by physiological oxygen tensions in primary rat hepatocyte cultures. Biochem Biophys Res Commun 1995;213(*2*):397-403.

57 Koo A, Komatsu H, Tao G, Inoue M, Guth PH, Kaplowitz N. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. Hepatology 1992;15(*3*):507-14.

58 Korthuis RJ, Gute DC, Cepinkas G, Kvietys PR. Cellular mechanism of acute versus delayed preconditioning. Pathophysiology 1998(*5*);35-48.

59 Kudo S, Kawano K. Role of interleukin-1 beta in the modulations of cytochrome P450 and heme metabolism in rat liver. J Interferon Cytokine Res 1999;19(*6*):601-7.

60 Larson E, Howlett B, Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination. Anal-Biochem 1986;155(*2*):243-8

61 Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A, Abraham NG. Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91(*13*):5987-91.

62 Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1

gene in response to hypoxia. J Biol Chem 1997;272(*9*):5375-81.

63 Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. Hepatology 2000;32(*2*):169-73.

64 Liang M, Croatt AJ, Nath KA. Mechanisms underlying induction of heme oxygenase-1 by nitric oxide in renal tubular epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol 2000;279:F728-F735.

65 Lincoln BC, Healey JF, Bonkovsky HL. Regulation of hepatic haem metabolism. Disparate mechanisms of induction of haem oxygenase by drugs and metals. Biochem J 1988;250(*1*):189-96.

66 Liu Y, Christou H, Morita T, Laughner E, Semenza GL, Kourembanas S. Carbon monoxide and nitric oxide supress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5' enhancer. J Biol Chem 1998;273(*24*):15257-62.

67 Liu Y, Ortiz de Montellano PR. Reaction intermeadiates and single turnover rate constants for the oxidation of heme by human heme oxygenase-1. J Biol Chem 2000;275(*8*):5297-5307.

68 Losser MR, Payen D. Mechanisms of liver damage. Semin Liver Dis 1996;16(*4*):357-67.

69 Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-275

70 Luss H, Beger HG, Nüssler AK. Expression and detection of inducible nitric oxide synthase in experimental models of inflammation. Methods: A companion to Methods Enzymol 1996;10:51-60

71 Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. FASEB J 1988;2(*10*):2557-68.

72 Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1997;37:517-54.

73 Marilena G. New physiological importance of two classic residual products: carbon monoxide and bilirubin. Biochem Mol Med 1997;61(*2*):136-42.

74 Marks GS, McCluskey SA, Mackie JE, Riddick DS, James CA. Disruption of hepatic heme biosynthesis after interaction of xenobiotics with cytochrome P-450. FASEB J 1988;2(*12*):2774-83.

75 Marton LS, Wang X, Kowalczuk A, Zhang ZD, Windmeyer E, Macdonald RL. Effects of hemoglobin on heme oxygenase gene expression and viability of cultured smooth muscle cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000;279(*5*):H2405-13.

76 Matsumoto A, Hanayama R, Nakamura M, Suzuki K, Fujii J, Tatsumi H, Taniguchi N. A high expression of heme oxygenase-1 in the liver of LEC rats at the stage of hepatoma: the possible implication of induction in uninvolved tissue. Free Radic Res 1998;28(*4*):383-91.

77 Maulik N, Engelman RM, Wei Z, Liu X, Rousou JA, Flack JE, Deaton DW, Das DK. Drug-induced heat-shock preconditioning improves postischemic ventricular recovery after cardiopulmonary bypass. Circulation 1995;92(*9 Suppl*):II381-8.

78 McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med 1985;312(*3*):159-63.

79 McCoubrey WK Jr, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. Eur J Biochem 1997;247(*2*):725-32.

80 Mochida S, Arai M, Ohno A, Masaki N, Ogata I, Fujiwara K. Oxidative stress in hepatocytes and stimulatory state of Kupffer cells after reperfusion differ between warm and cold ischemia in rats. Liver 1994;14(*5*):234-40.

81 Morita T, Perrella MA, Lee ME, Kourembanas S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92(*5*):1475-9.

82 Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Calabrese V, Clark JE, Green CJ. Endothelial Heme Oxygenase-1 induction by hypoxia Modulation by inducible nitric-oxide synthase and S-nitrosothiols. J Biol Chem 2000; 275(18):13613-20

83 Motterlini R, Foresti R, Intaglietta M, Winslow RM. NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to

endothelium. Am J Physiol 1996;270(*1 Pt 2*):H107-14.

84 Nussler AK, Geller DA, Sweetland MA, Di Silvio M, Billar TR, Madariaga JB, Simmons RL, Lancaster jr JR. Induction of nitric oxide synthesis and its reactions in cultured human and rat hepatocytes stimulated with cytokines plus LPS. Biochem Biophys Res Commun 1993;194(*2*):826-35.

85 Nussler AK, Di Silvio M, Billar TR, Hoffman RA, Geller DA, Selby R, Madariaga J, Simmons RL. Stimulation of the Nitric Oxide Sythase Pathway in Human Hepatocytes by Cytokines and Endotoxin. J Exp Med 1992;176:261-264.

86 Nutter LM, Sierra EE, Ngo EO. Heme oxygenase does not protect human cells against oxidant stress. J Lab Clin Med 1994;123(*4*):506-14.

87 Odaka Y, Takahashi T, Yamasaki A, Suzuki T, Fujiwara T, Yamada T, Hirakawa M, Fujita H, Ohmori E, Akagi R. Prevention of halothane-induced hepatotoxicity by hemin pretreatment: protective role of heme oxygenase-1 induction. Biochem Pharmacol 2000;59(*7*):871-80.

88 Olynyk JK, Matuschak GM, Lechner AJ, Britton RS, Tredway TL, O'Neill R, Bacon BR. Differential production of TNF by Kupffer cells after phagocytosis of E.coli and C.albicans. Am J Physiol 1994;267(*Gastrointest. Liver Physiol 30*):G213-19

89 Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. Nat Med 2000;6(*4*):422-8.

90 Otterbein LE, Choi AM. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000;279(*6*):L1029-37.

91 Parks DA, Granger DN. Ischemia-reperfusion injury: a radical view. Hepatology 1988;8(*3*):680-2.

92 Pellacani A, Wiesel P, Sharma A, Foster LC, Huggins GS, Yet SF, Perrella MA. Induction of heme oxygenase-1 during endotoxemia is downregulated by transforming growth factor-beta1. Circ Res 1998;83(*4*):396-403.

93 Poss KD, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94(*20*):10925-30.

94 Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. FASEB J 1999;13(*1*):155-68.

95 Rauen U, Viebahn R, Lauchart W, de Groot H. The potential role of reactive oxygen species in liver ischemia/reperfusion injury following liver surgery. Hepatogastroenterology 1994;41(*4*):333-6.

96 Rizzardini M, Terao M, Falciani F, Cantoni L. Cytokine induction of haem oxygenase mRNA in mouse liver: Interleukin 1 transcriptionally activates the haem oxygenase gene. Biochem J 1993;290:343-347.

97 Rook G. Kapitel 9: Zellvermittelte Immunantwort. Herausgeber: Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Kurzes Lehrbuch der Immunologie. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1991. ISBN3-13-702102-2

98 Ryter SW, Si M, Lai CC, Su CY. Regulation of endothelial heme oxygenase activity during hypoxia is dependent on chelatable iron. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000;279(*6*):H2889-H2897.

99 Samali A, Cotter TG. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. Exp Cell Res 1996;223(*1*):163-70.

100 Schoenberg MH, Nüssler AK, Beger HG. Sauerstoffradikale und Stickstoffmonoxid in der Sepsis. Chirurg 1995;66(1):18-26

101 Shan Y, Pepe J, Lu TH, Elbirt KK, Lambrecht RW, Bonkovsky HL. Induction of the heme oxygenase-1 gene by metalloporphyrins. Arch Biochem Biophys 2000;380(*2*):219-27.

102 Shibahara S, Muller RM, Taguchi H. Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. J Biol Chem 1987;262(*27*):12889-92.

103 Shinoda Y, Suematsu M, Wakabayashi Y, Suzuki T, Goda N, Saito S, Yamaguchi T, Ishimura Y. Carbon monoxide as a regulator of bile canalicular contractility in cultured rat hepatocytes. Hepatology 1998;28(*2*):286-95.

104 Shu, Z. Jung M., Beger H. G., Marzinzig M., Han F., Butzer U., Brucker U.B., Nüssler A.K. PH-dependent changes of nitric oxide, peroxynitrite and reactive oxygen species in hepatocellular damage. Am J Physiol 1997;273: G1118-

G1126

105 Soares MP, Lin Y, Anrather J, Csizmadia E, Takigami K, Sato K, Grey ST, Colvin RB, Choi AM, Poss KD, Bach FH. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. Nat Med 1998;4(*9*):1073-7.

106 Sonin NV, Garcia-Pagan JC, Nakanishi K, Zhang JX, Clemens MG. Patterns of vasoregulatory gene expression in the liver response to ischemia/reperfusion and endotoxemia. Shock 1999;11*(3*):175-9.

107 Srivastava KK, Cable EE, Donohue SE, Bonkovsky HL. Molecular basis for heme-dependent induction of heme oxygenase in primary cultures of chick embryo hepatocytes. Demonstration of acquired refractoriness to heme. Eur J Biochem 1993;213(*3*):909-17.

108 Suematsu M, Ishimura Y. The heme oxygenase-carbon monoxide system: a regulator of hepatobiliary function. Hepatology 2000;31(*1*):3-6.

109 Suttner D, Dennery PA. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. FASEB 1999;13:1800-1809.

110 Takahashi S, Takahashi Y, Ito K, Nagano T, Shibahara S, Miura T. Positive and negative regulation of the human heme oxygenase-1 gene expression in cultured cells. Biochim Biophys Acta 1999;1447(*2-3*):231-5.

111 Taylor JL, Carraway MS, Piantadosi CA. Lung-specific induction of heme oxygenase-1 and hyperoxic lung injury. Am J Physiol 1998;274(*4 Pt 1*):L582-90.

112 Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS. Effect of tumor necrosis factor-α and interleukin-1α on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. Am J Physiol 1998;274*(heart circ physiol 43*): H883-91.

113 Teti G. Septic shock caused by Gram-Positive bacteria. Trends in Microbiology 1999;7(*3*):100-101.

114 Thorup C, Jones CL, Gross SS, Moore LC, Goligorsky MS. Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. Am J Physiol 1999;277(*6 Pt 2*):F882-9.

115 Turcanu V, Dhouib M, Poindron P. Nitric oxide synthase inhibition by haem

oxygenase decreases macrophage nitric-oxide-dependent cytotoxicity: a negative feedback mechanism for the regulation of nitric oxide production. Res Immunol 1998;149(*7-8*):741-4.

116 Vesely MJ, Exon DJ, Clark JE, Foresti R, Green CJ, Motterlini R. Heme oxygenase-1 induction in skeletal muscle cells: hemin and sodium nitroprusside are regulators in vitro. Am J Physiol 1998;275(*4Pt1*):C1087-94.

117 Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. Nat Med 1996;2(*1*):87-90.

118 Woo J, Iyer S, Cornejo MC, Mori N, Gao L, Sipos I, Maines M, Buelow R. Stress protein-induced immunosuppression: inhibition of cellular immune effector functions following overexpression of haem oxygenase (HSP 32). Transpl Immunol 1998;6(*2*):84-93.

119 Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Lie R, Suzuki T, Nakayama K, Takeda A, Yamaguchi T, Itoyama Y, Sekizawa K, Sasaki H. Protective effects of heme oxygenase-1 against oxidant-induced injury in the cultured human tracheal epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol 1999;21(*3*):428-35.

120 Ye J, Laychock SG. A protective role for heme oxygenase expression in pancreatic islets exposed to interleukin-1beta. Endocrinology 1998;139(*10*):4155-63.

121 Yee EL, Pitt BR, Billiar TR, Kim YM. Effect of nitric oxide on heme metabolism in pulmonary artery endothelial cells. Am J Physiol. 1996;271(*4 Pt 1*):L512-8.

122 Yoshida T, Biro P, Cohen T, Muller RM, Shibahara S. Human heme oxygenase cDNA and induction of its mRNA by hemin. Eur J Biochem 1988;171(*3*):457-61.

123 Zakhary R, Poss KD, Jaffrey SR, Ferris CD, Tonegawa S, Snyder SH. Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94(*26*):14848-53.

124 Zwacka RM, Zhang Y, Zhou W, Halldorson J, Engelhardt JF. Ischemia/reperfusion injury in the liver of BALB/c mice activates AP-1 and nuclear factor kappaB independently of IkappaB degradation. Hepatology 1998;28(*4*):1022-30.

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyze - „analysis of variance“
APS	Ammonium peroxydisulfate
AP-1/ -2	Activator Protein-1/ -2
Aqua dest	Aqua destillata
AST (GOT)	Aspartat-Amino-Transferase
ATP	Adenosin-Triphoshat
CDNA	Copy-DNA, Komplementäre DNA
CGMP	Zykl. Guanosinemonophosphat
CO	Kohlenmonoxid
CM	Zytokinmix
CoPP	Cobalt Protoporphyrin
CT	Kontrollgruppe (negativ)
D	Deutschland
DEPC-H_2O	Diethyl-Pyrocarbonat - H_2O
DANN	Desoxyribonucleinsäure
DTT	DL-dithiotthreitol
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-N,N,N’,N’-tetraacetylsäure
DATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCTP	Desoxycytidintriphosphat
DGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNTP´s	Desoxynucleinphosphats
DTTP	Desoxythymidintriphosphat

HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
HIV	Human Immune deficiency virus
HO-1/ -2/ -3	Hämoxygenase-1/ -2/ -3
HSPs	Hitze-Schock-Proteine
IFN-γ	Interferon-γ
IL-1β	Interleukin-1 β
I/ R	Ischämie/ Reperfusion
LDH	Laktat Dehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
MRNA	Messenger Ribonucleinsäure
NADH	Reduziertes Nicotinamid-adenindinucleotid$^+$ (NAD^+)
NADPH	Nicotinamid-adenindinucleotid-phosphat (reduziert)
NFκB	Nukleärer Faktor κB
NO	Nitric Oxide - *Stickstoffmonoxid* -
NOS	NO-Synthase
PBS	Phosphatpuffer
PC	Positiv Kontrolle
PCR	Polymeraseketten-reaktion
Per I/ II	Perfusionslösung I/ II
PMSF	Phenylmethyl-Sulfonylflourid
PVDF	Polyvenylidenedifluorid
RNA	Ribonucleinsäure
ROI	Reactive Oxygen Intermediates
ROS	Reaktive Oxygen Spezies

SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SNAP	S- nitrosoacetylpenicillamin
TCA	Trichlorsäure
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethyletyenediamine
TES	N-tris(Hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure)
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α
UV	Ultraviolett

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. A. K. Nüssler für die Überlassung des interessanten Themas, für die Betreuung und Unterstützung und auch für die Korrektur der Arbeit. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. P. Neuhaus, Direktor der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie der Medizischen Fakultät der Charité sowie allen Oberärzten dieser Klinik für die freundliche Zusammenarbeit bei der Gewinnung des Lebergewebes, ohne deren Hilfe diese Arbeit an humanen Hepatozyten nicht möglich gewesen wäre.l Ebenso möchte ich den Mitarbeitern des Transplantationslabores, Susanne Wojtke, Anja Schirmeier und Liegang Liu für die freundliche und kooperative Zusammenarbeit danken. Außerdem danke ich ganz herzlich meiner Familie und Freunden. Es war mir eine große Hilfe, daß sie immer ein offenes Ohr für die anstehenden Probleme hatten.

Lebenslauf

Name:	Eda Müller, geb. Tüzüner
Geburtsdatum:	22.09.1974
Geburtsort:	Denizli, Türkei
Staatsangehörigkeit:	Türkisch
Sprachkenntnisse:	Türkisch, Englisch, Deutsch
Eltern:	Nural Tüzüner
	Süzan Tüzüner, geb. Kesimli
Schulbildung	Ankara Grundschule, Izmir, Türkei (1980-85)
	Bornova Anadolu Lisesi (Mittelstufe), Izmir, Türkei (1985-89); (Vorbereitungsjahr in englischer Sprache und 3 Jahre allgemeine Ausbildung)
	Izmir Fen Lisesi (Oberstufe), Izmir, Türkei (1989-92)
Studium i.d. USA:	Twin City Christian Academy (Senior Year), Festus, Missouri (1992-1993)
Medizinstudium:	Hacettepe Universität, Medizische Fakultät, Ankara (1992-1999)
Studien in Deutschland:	PJ im Fach Augenheilkunde, Augenklinik, Charité, Humboldt Universität zu Berlin (Juli 1998)
Hochschulabschluß:	Medizische Fakultät, Hacettepe Universität , Ankara, Türkei 30. Juni 1999
Nachweis der Gleichwertigkeit des türkischen Abschlusses:	Humboldt Universität zu Berlin, 19. Mai 2000
Promotionsstudium:	Humboldt Universität zu Berlin, Klinik für Chirurgie Leiter: PD Dr. Andreas K. Nüssler 08/1999 -12/2000
ÄiP	I. Innere Klinik, Abt. für Nephrologie, HELIOS Kliniken, Klinikum Berlin-Buch,

Direktor: Prof. Dr. F.C. Luft; seit 01/2001 bis heute

Stipendium: ‘Verein zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses in der Medizin‘, Ulm, Germany

Auszeichnungen: 25. Platz der landesweiten Aufnahmeprüfung für die Oberstufe in der Türkei, 1989

1. Platz im Mathematikwettbewerb, Bob Jones University, Greenville, South Carolina, USA, 1993

2. Platz im naturwissenschaftlichen Wettbewerb, Christian Schools von 4 US-Bundesstaaten, Greenville, South Carolina, USA, 1993

Reisestipendium von der ’Society for Leucocyte Biology’, Cambridge, Massachusetts, USA, 2000

eigene Arbeiten

1. Ogawa T, Nussler AK, Tüzüner E, Berger HG. Contribution of nitric oxide to the protective effects of ischemic preconditioning in ischemia-reperfused rat kidneys. J Lab Clin Med 2001 Jul;138(1):50-8.

2. Ogawa T, Nussler AK, Tüzüner E, Mimura Y, Kaminishi M, Berger HG. Inhibition of nitric oxide synthase does not influence urinary nitrite/ nitrate excretion after renal ischemia reperfusion injury. (Langenbecks Arch Surg, im Druck)

3. Tüzüner E, Liu L, Glanemann M, Settmacher U, Bechstein WO, Müller A, Neuhaus P, Nussler AK. Induction and Regulation of Heme oxygenase-1 in Human Hepatocytes following various Insults of Stress (Manuskript in Vorbereitung).

4. Tüzüner Eda. Induktion der Hämoxygenase-1 an humanen Hepatozyten während kalter und warmer Ischämie. Transplantationschirurgie, Humboldt Universität zu Berlin (Vortrag, Berlin, 2000)

5. Tüzüner E, Liu L, Glanemann M, Settmacher U, Bechstein WO, Müller A, Neuhaus P, Nussler AKN. Induction and Regulation of Heme oxygenase-1 in Human Hepatocytes following various Insults of Stress. 34th Annual Meeting ,

Society for Leukocyte Biology, Cambridge, Massachusetts, USA. (Poster, Boston, 2000)

6. Tüzüner E, Liu L, Glanemann M, Settmacher U, Bechstein WO, Müller A, Neuhaus P, Nussler AK. Induktion und Regulation der Hämoxygenase-1 [ho-1] in Humanen Hepatozyten unter Inflammatorischen Bedingungen (Vortrag, Weinheim, 2000)

7. Tüzüner E, Liu L, Glanemann M. Settmacher U, Müller AR, Langrehr JM, Jonas S, Steinmüller T, Neuhaus P, Nussler AK. Induction of Heme Oxygenase-1 Protects Human Liver Cells Against warm and Cold Hypoxia. International Liver Transplantation Society, Berlin (Vortrag, Berlin, 2001)