

Michael Max Karl Sachse
Dr. med.

Expression des Komplement C5a Rezeptors auf primären humanen Hepatozyten

Geboren am 03.10.1975 in Göttingen
3. Staatsexamen am 29.10.2003 an der Universität Göttingen

Promotionsfach: Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. vet. med. M. Kirschfink

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des Komplement C5a Rezeptors (CD88) auf primären humanen Hepatozyten untersucht. Die zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Erkenntnisse zu diesem Thema waren auf drei Publikationen limitiert, basierten auf den Ergebnissen von maximal je zwei untersuchten Leberpräparaten und widersprachen sich hinsichtlich ihrer Beantwortung der o.g. Fragestellung.

Der von uns erbrachte Nachweis des hepatozytären C5aR basiert auf der histologischen Darstellung an insgesamt 13 unterschiedlichen, humanen Leberpräparaten. Die immunzytochemische Untersuchung von CD88 erfolgte an insgesamt 19 humanen Leberzellkulturen. Aufgrund einer z.T. nur sehr geringen C5aR Expression der untersuchten Zellkulturen reduzierten wir zunächst den Anteil kontaminierender Zellen (wie z.B. C5aR positive Kupffer Zellen) mit Hilfe des MACS Verfahrens. Diese Methode führte zu einer hoch signifikanten Reduktion kontaminierender Zellen ($p \leq 0,0001$). In den hochaufgereinigten Hepatozytenkulturen erbrachten wir in insgesamt 11 unterschiedlichen Präparationen den molekularbiologischen Nachweis von C5aR mRNA. Eine Stimulation dieser Zellkulturen mit rhuIL-6 oder rhuC5a führte in allen Ansätzen ($n=5$) zu einer Hochregulation von C5aR mRNA. Unter funktionellen Gesichtspunkten zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Expression der Akute Phase Proteine (APP) CRP, A1AT und A2MG auf mRNA Ebene. Funktionelle Auswirkungen einer kombinierten IL-6/C5a Stimulation spiegelten sich darüber hinaus in einer veränderten A2MG- und Albuminsynthese der Hepatozyten wider.

Bei den histologischen Studien zeigte sich eine stark variierende Verteilung des C5aR im humanen Lebergewebe. Insbesondere bei Leberpräparaten ohne lichtmikroskopisch erkennbare Entzündungen waren nicht alle Hepatozyten C5aR positiv. Diese Beobachtung setzte sich auch bei den z.T. nur schwach CD88 positiven FACS-Färbungen fort; in nur 8/19 Isolationen stellten sich die untersuchten Hepatozyten als C5aR positiv dar. Auch auf molekularbiologischer Ebene lagen trotz einer in allen hochaufgereinigten Kulturen

detektierbaren C5aR mRNA Expression mit basalen Transkriptzahlen zwischen 31 und 203/ μ l cDNA erhebliche Unterschiede vor.

In den Funktionsuntersuchungen setzte sich diese Heterogenität fort. So trat beispielsweise bei einzelnen Präparationen unter kostimulatorischer Inkubation mit IL-6/C5a (24/1h) eine im Vergleich zur Kontrollgruppe um bis zu 120% erhöhte C5aR mRNA Expression auf, während es in einem anderen Ansatz unter der gleichen Stimulation zu einer mehr als 70%igen Verringerung der Expression kam.

Diese auch für die nach Stimulation ermittelten Expressionsunterschiede von APP verdeutlichen die bei humanen Studien grundsätzlich zu diskutierenden Limitierungen.

Trotz detaillierter Informationen über die Herkunft der untersuchten Leberpräparate (Tab. 3-1; 3-2; 3-4) sind die Auswirkungen prä- und postoperativer Faktoren (z.B. Chemotherapie, Neoplasie, Entzündung, Segmentresektion versus Hemihepatektomie, Einfluss einer MACS Separation) auf die in dieser Arbeit untersuchten Parameter noch weitgehend unbekannt. Weitreichendere Studien oder höhere Fallzahlen waren aufgrund der begrenzten Resektatressourcen nicht umzusetzen. Hier wog insbesondere der im Rahmen einer wenn auch hochsignifikanten Aufreinigung der Hepatozytenkultur zu beobachtende, bis zu 50% Zellverlust der Ausgangsmenge besonders schwer.

Der bereits zuvor erwähnte, z.T. nur fokale C5aR Nachweis sowie die aufgezeigte Funktionalität des C5aR unter experimentellen Stimulationsbedingungen werfen die Frage nach einer besonderen Rolle dieses Rezeptors als auch der CD88 exprimierenden Hepatozyten bei der Initiierung bzw. Modifikation von Entzündungs- als auch postoperativen Regenerationsvorgängen auf. Wir diskutieren ein „Wachspostenmodell“ des hepatozytären C5aR, wonach CD88 unter physiologischen Bedingungen lediglich auf einem geringen Prozentsatz der Hepatozyten nachweisbar ist und bei der Entzündungsreaktion mit oder ohne Komplementbeteiligung auch von weiteren Leberzellen hochreguliert wird.

Bei der Pathogenese von Ischämie-/Reperfusionsschäden wird dem C5aR aufgrund der Synthese proinflammatorischer Mediatoren eine bedeutende Rolle zugeschrieben. In verschiedenen Sepsis- bzw. Ischämie-/Reperfusionsmodellen konnte durch Gabe von anti-C5 oder -C5a Antikörpern die Überlebensrate deutlich gesteigert werden. Mit dem Nachweis des C5aR auf primären Hepatozyten und der Beschreibung des C5L2 Rezeptors als einem „Gegenspieler“ zum CD88 Protein wären entsprechende Untersuchungen an menschlichem Lebergewebe sinnvoll. Besonders spannend wäre dabei die weitere Abklärung der in unseren Präparaten C5aR negativen Areale mit konsekutiven Funktionsuntersuchungen.