

Molekulare Mechanismen der ME3738 induzier- ten Leberprotektion im Concanavalin-A Modell der experimentellen Hepatitis

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Christian Klein

geboren am 05.04.1969 in Wolfsburg

im Juni 2002

Die vorliegende Arbeit wurde von Prof. Dr. W. Müller betreut und unter der Leitung von Prof. Dr. C. Trautwein in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie unter Vorsitz von Prof. Dr. M. P. Manns in der Zeit von August 1999 bis Juni 2002 durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. rer. nat. W. Müller

Koreferent: Prof. Dr. med. C. Trautwein

Tag der Promotion: 1. Juli 2002

Zusammenfassung:

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Analyse der ME3738 induzierten molekularen Mechanismen, die im Verlauf der ConA induzierten experimentellen Hepatitis zu einer Protektion der Leber führen.

ME3738 ist ein Sapogenin mit triterpenoider Struktur. Ziel der Untersuchungen ist der Einsatz der Substanz in der Therapie entzündlicher Lebererkrankungen.

Das Ergebnis der Untersuchungen ist, dass die Therapie mit ME3738 zu einem Anstieg der IL6 Konzentrationen im Serum führt. Im Modell der ConA induzierten Hepatitis vermittelt dieser Mechanismus den Schutz der Leber. Die Bildung nekrotischer Areale und der Anstieg der Aktivität der Serumtransaminasen werden durch die Behandlung mit ME3738 inhibiert.

ME3738 aktiviert protektive Signalkaskade, die durch den Rezeptor gp130 vermittelt werden. In Hepatozyten wird durch gp130 zytoplasmatisches STAT3 aktiviert und in den Kern transloziert. Nukleäres STAT3 vermittelt die Transkription spezifischer Zielgene. Für die ME3738 abhängige und IL6 induzierte SAA2-Transkription und SAA2-Proteinexpression ist die Präsenz des Rezeptors gp130 in Hepatozyten essentiell.

Die ConA Injektionsexperimente an hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} bzw. an IL6^{-/-} Mäusen belegen, dass die ME3738 induzierte Protektion im ConA Modell spezifisch über die Aktivierung IL6/gp130 abhängiger Signalkaskaden in Hepatozyten vermittelt wird.

Fehlt der Rezeptor gp130 in Hepatozyten ist weder durch ME3738 Therapie noch durch Injektion von rekombinanten IL6 ein Schutz der Leber im Verlauf der ConA Hepatitis zu induzieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Regulierung IL6/gp130 abhängiger Signalwege in der Leber ein mögliches therapeutisches Ziel für die Behandlung inflammatorischer Lebererkrankungen darstellen kann.

Schlagworte: gp130-Rezeptor, entzündliche Lebererkrankungen, ME3738

Summary:

The aim of this work was to analyze the molecular mechanisms of ME3738 induced liver protective events in the ConA mouse model of experimental hepatitis.

Me3738 is triterpenoid sapogenenin. It was developed as a new drug for the treatment of liver diseases.

ME3738 treatment leads to elevated Interleukin-6 serum levels, which results in the induction of liver protective pathways in hepatocytes. The ConA induced increase of serum transaminases and the formation of necrotic areas in the livers of ConA injected mice were significantly reduced, when mice are treated with ME3738.

ME3738 activates a protective signal transduction pathway, mediate by the transmembrane receptor gp130 in hepatocytes. The elevated IL6 serum levels results in a gp130 dependend increase of nuclear STAT3. Activated nuclear STAT3 triggers the transcription of specific target genes like acute phase genes or anti-apoptotic factors. Hepatocyte specific gp130 knockout mice showed no ME3738/IL6 inducible activation of STAT3 and the acute phase gene SAA2. In contrast, ME3738 injected wild-type mice showed a strong expression of SAA2-mRNA and –protein.

The ME3738 stimulation of IL6- and hepatocyte specific gp130-knockout mice before ConA application could not protect these animals from the ConA induced liver damage. The result indicates that the ME3738 induced protection is triggert through IL6/gp130 dependend signals in hepatocytes.

To prove the protective potential of IL6 in the ConA model, IL6- and hepatocyte specific gp130 knockout mice were treated with IL6 before the induction of ConA liver damage. The injection of recombinant IL6 in IL6- and gp130 knockout mice before ConA application showed, that the IL6 triggert protection is mediated through gp130 in hepatocytes. No protection was seen in hepatocyte specific gp130 knockout mice. In contrast the IL6 injection protects IL6 knockout mice from ConA liver damage.

The results of this study indicates, that the therapeutic manipulation of IL6/gp130 dependend signal pathways could be a promising target for the treatment of human inflammatory liver diseases in the future.

Keywords: gp130-receptor, inflammatory liver disease, ME3738

INHALTSVERZEICHNIS.....1

DANKSAGUNG.....5

1 EINLEITUNG:..... 7

1.1	Leberfunktionen:	7
1.2	Zellverluste erfordern Zellneubildungen: Die Leberregeneration:	8
1.3	Die disregulierte Leberregeneration, Fibrogenese und Leberzirrhose:	9
1.4	Im Verlauf viraler Hepatitiden kommt es zur Leberzirrhose:	9
1.5	Die Rolle von Zytokinen bei viral induzierten Lebererkrankungen:	10
1.6	Das Concanavalin-A Modell simuliert eine zytokinabhängige Hepatitis:	11
1.7	ME3738:	13
1.7.1	Pharmakologische Daten und chemische Struktur von ME3738:	13
1.8	Interleukin 6:	15
1.8.1	Klassifizierung:.....	15
1.9	Der IL6/gp130 Signalweg:	16
1.9.1	Struktur von gp130:	16
1.9.2	Die IL6 induzierte gp130 abhängige Signaltransduktion:	17
1.9.3	STAT Aktivierung:.....	18
1.9.4	Der Ras-MAP-Kinase Signalweg:.....	18
1.10	IL6 bzw. gp130 knockout Mäuse dienen der Analyse des Signalwegs in Modellen der Leberschädigung.	19
1.10.1	Gp130 knockout Mäuse	19
1.10.2	IL6 knockout Mäuse:.....	19
1.11	Die Akut Phase Reaktion:	20
1.11.1	SAA2:.....	20
1.12	Ziel der Arbeit:	22

2 MATERIAL UND METHODEN:..... 23

2.1	Medium für Bakterien:	23
2.2	Verwendete Bakterienstämme:	23
2.3	Verwendete Plasmide:	24
2.3.1	pBS (Fa. Stratagene):.....	24
2.3.2	pGEM-T-Vektor: (Fa.Promega):.....	24
2.3.3	pRS1-SAA-2:	24
2.3.4	pBS-Hemopexin:.....	24
2.3.5	pGEM-T-Vektor-IL6:	24
2.3.6	pBS Socs3:.....	25
2.4	Rekombinante Proteine:	25
2.4.1	rhIL-6:	25
2.5	Chemikalien:	25
2.5.1	Liste der verwendeten Chemikalien:.....	25
2.5.2	Radiochemikalien:	28
2.6	Molekulargewichtsmarker:	28
2.6.1	DNA-Marker:.....	28

2.6.2	Protein-Marker:	28
2.7	Enzyme:	28
2.8	Antikörper:	28
2.9	Oligonukleotide:	29
2.10	Sonstige Materialien:	30
2.11	Geräte:	30
2.12	Tierexperimentelle Methoden:	32
2.12.1	Injektionen:	32
2.12.2	Retroorbitale Blutentnahme:	33
2.12.3	Tiertötung und Gewebeentnahmen:	33
2.13	DNA-Präparation und -Analyse:	34
2.13.1	Agarose-Gelelektrophorese:	34
2.13.2	Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren:	34
2.13.3	Isolierung von Plasmid DNA:	37
2.13.4	Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien:	38
2.13.5	Isolierung genomischer DNA aus Mausleberbiopsien	39
2.13.6	Alkalischer Southern-Blot.....	39
2.13.7	Polymerasekettenreaktion (PCR):	41
2.13.8	DNA Sequenzierung:	42
2.14	Protein-Präparation und -Analyse:	43
2.14.1	Isolierung nukleärer Proteine aus Lebergewebe :	43
2.14.2	Bestimmung der Proteinkonzentration:	45
2.14.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page):	46
2.14.4	SDS-Gelfärbung mit Comassie-Brilliant Blue:	48
2.14.5	Western Blot:	48
2.14.6	Gel-Retentionsanalyse:	49
2.14.7	Quantifizierung der Transkriptionsfaktor Bindungsaktivität (Mercury™ transfactor Kit):	53
2.14.8	ELISA (enzyme linked immunosorbent assay):	53
2.14.9	Messung der Aktivität der Aminotransferasen GOT und GPT:	54
2.15	RNA Präparation und –Analyse:	55
2.15.1	RNA Isolierung aus Gewebe:	55
2.15.2	Bestimmung der RNA-Konzentration:	55
2.15.3	Northern-Blot:	56
3	<u>ERGEBNISSE</u>	60
3.1	ME3738 wirkt protektiv im ConA Modell der experimentellen Hepatitis:	60
3.1.1	ME3738 Vorbehandlung verhindert die ConA induzierte Leberzelldegeneration:	60
3.1.2	ME3738 verändert das Zytokinmilieu der ConA Hepatitis:	65
3.1.3	ME3738 Therapie verändert die TNF abhängige hepatozelluläre Signaltransduktion:	67
3.1.4	ME3738 induziert eine verstärkte hepatische STAT3 Aktivierung:	69
3.1.5	ME3738 reduziert die ConA induzierte Jun-Kinase-Aktivität:	71
3.2	ME3738 Injektion führt zu einer Erhöhung der IL6 Serumkonzentrationen:	73
3.2.1	Als Folge der erhöhten IL6 Serumkonzentrationen wird eine STAT3 abhängige Signalkaskade aktiviert:	74

3.2.2	Me3738 induziert die Expression der Proteine SAA2 und Hemopexin:	75
3.2.3	In der Leber und Milz ist keine ME3738 induzierbare IL6 Transkription detektierbar:.....	75
3.3	Die Wirkung der ME3738 Injektion bei IL6-/- Mäusen und hepatozytenspezifischen gp130 knockout Tieren:	77
3.3.1	Die hepatozytenspezifischen gp130-/- Mäuse (alfpCre+/gp130loxP):	78
3.3.2	Die ME3738 induzierte Erhöhung der IL6 Serumkonzentrationen ist in den hepatozytenspezifischen gp130-/- Mäusen (alfpCre+/gp130loxP) nachweisbar.....	80
3.3.3	Die ME3738 abhängige STAT3 Aktivierung ist in IL6-/- Mäusen und hepatozytenspezifischen gp130 -/- Mäusen blockiert:	81
3.3.4	Die durch ME3738 Injektion induzierte Akut Phase Reaktion ist IL6/gp130 abhängig:	83
3.3.5	ME3738 induziert IL6 abhängig die nukleäre Translokation von NFkB p50 in nicht-parenzymatischen Leberzellen:.....	85
3.4	Bei IL6-/- Tieren reduziert ME3738 Therapie die ConA induzierten Leberschäden nicht:.....	86
3.4.1	ME3738 Behandlung verursacht keine verringerte Aktivität der Serumtransaminasen bei hepatozytenspezifischen gp130 -/- Mäusen im Verlauf der ConA Hepatitis:	88
3.4.2	Der Verlauf der ConA induzierten TNF Serumkonzentrationen ist bei gp130-/- Mäusen unverändert.	90
3.4.3	Die ConA induzierte IL6 Sekretion ist in hepatozytenspezifischen gp130-/- Mäusen erhöht.....	92
3.4.4	In hepatozytenspezifischen gp130-/- Mäusen ist im Verlauf der ConA Hepatitis keine hepatozelluläre STAT3 Aktivierung detektierbar.	94
3.4.5	Die SOCS3 mRNA Expression in der Leber von alfpCre+/gp130loxP Tieren ist im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert.....	95
3.4.6	Hepatozytenspezifische gp130-/- Tiere exprimieren im Verlauf der ConA Hepatitis kein SAA2.	96
3.5	IL6 Präinjektion schützt IL6-/- Mäuse vor ConA induzierten Leberschaden; bei hepatozytenspezifische gp130-/- Mäusen hat IL6 keinen Einfluss auf den Untergang von Hepatozyten.....	98
4	<u>DISKUSSION:</u>	100
4.1	ME3738 ist ein hepatoprotektiv wirksames Sapogenin:.....	100
4.2	ME3738 induziert einen Anstieg der IL6 Konzentrationen im Serum behandelter Mäuse:	101
4.3	Durch ME3738 werden in Hepatozyten gp130 vermittelt STAT3 abhängige Signalwege aktiviert:	103
4.4	ME3738 induziert in Hepatozyten IL6/gp130 abhängig die Expression von Akut-Phase-Genen:	104
4.4.1	Welchen Protektionsmechanismus könnte SAA vermitteln?.....	105
4.4.2	IL6 aktiviert in Hepatozyten anti-apoptotische Signalwege:	106
4.5	Wildtyp Mäuse sind durch die ME3738 Therapie vor der Auspägung der ConA Hepatitis geschützt:	109
4.5.1	ME3738 Therapie reduziert die TNF Serumkonzentration im Verlauf der ConA Hepatitis:	109
4.5.2	Me3738 Therapie reduziert die hepatische NFkB Aktivierung:	110

4.5.3	ME3738 Therapie senkt die IL6 Serumkonzentrationen im Verlauf der ConA Hepatitis:	112
4.5.4	ME3738 Therapie verstärkt die STAT3 Aktivierung im Verlauf der ConA Hepatitis:.....	114
4.6	Bei IL6-/- und hepatozytenspezifischen gp130-/- Mäusen wirkt ME3738 Therapie in der ConA Hepatitis nicht protektiv:	114
4.7	Gp130-/- Tiere sind sensitiver gegenüber ConA induzierter Hepatitis:	115
4.7.1	Der Verlauf der IL6 Konzentrationsänderungen im Serum Con A injizierter gp130-/- Mäuse ist gegenüber Wildtyp Mäusen verändert	116
4.8	Der Einsatz von ME3738 und IL6 im Rahmen einer anti-Hepatitis Therapie.....	117
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG:</u>	118
6	<u>LITERATUR</u>	119
7	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	132
8	<u>VERÖFFENTLICHUNGEN.....</u>	136
9	<u>LEBENS LAUF.....</u>	137
10	<u>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</u>	139

Danksagung

Wesentlichen Anteil am Erfolg dieser Arbeit hatten die guten Arbeitsbedingungen in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover. Hierfür möchte ich Herrn Prof. Dr. med. M.P. Manns danken.

Herrn Prof. Müller danke ich für die Betreuung während der Promotion.

Herrn Prof. Dr. med. Christian Trautwein danke ich für die Überlassung des Themas, für seine Betreuung und sein stete Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt der Firma Meiji-Saika, insbesondere Herrn P.HD. Shoji Nishiyama (Director of Research and Development), Herrn Masayuki Miazaki und Herrn Hiroyuki Kuzuhara. Ohne die intensive und interdisziplinäre Zusammenarbeit wäre die erfolgreiche Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Meinen Eltern Lothar Klein und Monika Klein und Herrn Dr. med. Konrad Streetz möchte ich für das kritische Lesen bei der Anfertigung dieser Arbeit danken. Dr. rer. nat. Torsten Wüstefeld danke ich für die intensive wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Auch herzlich danken möchte ich meinen Kollegen für das gute Arbeitsklima in der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie:

Dr. Christian Liedtke, Frank Tacke, Nadine Gröger, Nils-Holger Zschemisch; den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von P.D. Dr. med. Stefan Kubicka: Dr. rer. nat. Florian Kühnel, Dr. vet. med. Bettina Fleischmann-Mundt, und Lars Zender; Anke Diessel, den Mitarbeitern der Hepatitis- und Lipiddiagnostik Regina Raupach, Peter Magerstedt, Monika Seifert, Karin Reccius und Brigitte Rausch; den Mitarbeitern der Autoimmundiagnostik Eleonore Schmidt und Stephanie Loges, den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dr. med. Lenhard Rudolph: Sonja Schätzlein, Stefanie Wiemann, Birthe Zipfel, und allen anderen Mitarbeitern der Abteilung.

Nicht zuletzt danke ich Uta Schäfer für die Schaffung des geeigneten Umfeldes, dass zur Anfertigung dieser Arbeit hilfreich beigetragen hat.

meinen Eltern Monika und Lothar

1 EINLEITUNG:

1.1 Leberfunktionen:

Die Leber ist das zentrale Organ des Stoffwechsels körpereigener und resorbierter Substanzen. Hinsichtlich der Vielfalt der metabolischen Prozesse ist die Leber einzigartig unter den Organen des menschlichen Körpers. Zum einen stellt der hepatischen Stoffwechsel Metabolite bereit, die dem Erhalt der Integrität der Leberstruktur und -funktion dienen. Zum anderen werden in der Leber Stoffwechselprodukte synthetisiert, die anderen Organen über den Blutstrom zur Verfügung gestellt werden.

Die topographische Lage zwischen den Resorptions- und peripheren Organen ermöglicht es der Leber ihre Funktion als Ort der Primärverwertung von resorbierten, niedermolekularen Bausteinen wahrzunehmen. Die Hepatozyten sind für Synthese, Aufbau und Speicherung einer großen Zahl unterschiedlicher Substanzen verantwortlich. Sie übernehmen die Hauptrolle im Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel des Körpers. Zudem wird von den Hepatozyten ein großer Teil der Proteine des Blutplasmas synthetisiert und sezerniert.

Dabei kommt der Anatomie der Leber für die Erfüllung ihrer Funktionen eine wichtige Rolle zu.

Der Leber wird Blut vom Darm über portal venöse Gefäße und die *Ateria hepatica* zugeführt. Durch ein arterielles System sich immer weiter verzweigender Blutgefäße wird der Blutstrom an die Portalfelder herangeführt und in die Lebersinusoide verteilt. Diese feinen Blutkapillaren versorgen die Hepatozyten mit Blut, getrennt nur von einer Lage abgeflachter Endothelzellen. Der Rücktransport venösen Blutes wird durch ein ähnlich komplexes Blutgefäßsystem sichergestellt.

Die Leber ist Ort von „Entgiftungs-“ und Exkretionsprozessen. Mit der Nahrung aufgenommene oder bei Stoffwechselprozessen anfallende toxische oder nicht weiterverwertbare Substanzen werden eliminiert bzw. durch biochemische Modifikationen in ausscheidungsfähige Derivate umgewandelt.

Da die meisten toxikologisch aktiven Moleküle lipophilen Charakters sind und unter physiologischen PH-Bedingungen nicht oder nur teilweise ionisiert vorliegen, ist es notwendig sie durch enzymatische Transformationen in eine ausscheidungsfähige Form zu bringen. Die wichtigsten an diesen Prozessen beteiligten hepatischen Enzyme sind in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (**ER**) lokalisiert. Ein

bekanntes Beispiel ist der Cytochrom P450-Monooxygenase-(CYP)-Enzymkomplex, bestehend aus bis zu 100 verschiedenen Proteinen¹.

Die Leber ist bei der Durchführung der „Entgiftung“ den zellschädigenden Wirkungen wie z. B. Lipid-Peroxidationen, oder Protein-Thiol-Oxidationen reaktiver Toxinmetabolite ausgesetzt. Jedes biologische System kann aber durch andauernde, übermäßige Schadstoffeinträge aus dem Gleichgewicht gebracht werden, es kommt zu Organschädigungen. Auch in der Leber sind solche Folgen beschrieben. So führt z. B. eine dauerhafte Alkoholintoxikation zu Zelldegeneration und nachfolgend zum Absterben von Hepatozyten.

1.2 Zellverluste erfordern Zellneubildungen: Die Leberregeneration:

Zellverlust kann durch Zellneubildung ausgeglichen werden. Die Leber ist ein Organ mit einer beachtenswerten Regenerationsfähigkeit. Sowohl der Zellverlust durch toxischen bedingten Nekrosen aber auch die Resektion großer Leberteile kann durch zeitlich und örtlich koordinierte Proliferation der verbleibenden Leberzellen kompensiert werden. Ein experimentelles Modell ist die Wiederherstellung der Lebermasse nach 2/3 Hepatektomie. Dieses Tiermodell wurde für die Untersuchung molekularer Ereignisse der kontrollierten Aktivierung von Proliferations-, De- und Redifferenzierungsereignissen etabliert². Da die Leber aus unterschiedlich differenzierten Zelltypen besteht, ist es essentiell, dass die Regeneration durch eine komplexe Regulation gesteuert wird. Eine Vielzahl molekularer Mediatoren wie z. B. IGF1, NFκB, STAT3 sind an diesen Prozessen beteiligt^{3,4,5}.

Die für die Aufrechterhaltung der Lebermasse notwendige Regenerationsfähigkeit kann aber auch für pathologische Veränderungen der Leber verantwortlich sein.

Unter anderem scheint bei der Entstehung von chronischen Leberschädigungen eine dysregulierte Proliferation eine wesentliche Rolle zu spielen.

1.3 Die disregulierte Leberregeneration, Fibrogenese und Leberzirrhose:

Eine der häufigsten pathologischen Strukturänderungen der Leber ist die Leberzirrhose. Wiederholt induzierte parenchymatische Nekrosen können zur Bildung nodulärer Regenerate und zu Veränderungen der *Extrazellulären Matrix (EM)* führen. Eine pathologische Ausweitung der Bereiche der extrazellulären Matrix wird als Fibrogenese bezeichnet.

Im Unterschied zur Regeneration nach einer Leberresektion ist bei der Leberzirrhose die Zellproliferation nicht ausreichend koordiniert. Es bilden sich isolierte und hyperplasierende Leberzell- und Gallengangsregenerate, die schließlich zu neoplastischen Transformationen führen können⁶.

Bei der pathologischen Fibrogenese stehen die *Ito-Zellen* als die Hauptsyntheseorte der hepatischen extrazellulären Matrix im Mittelpunkt. Eine gesteigerte Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix wie Prokollagen- α_1 durch *Ito-Zellen* wird u. a. durch Lipidperoxidation hervorgerufene Schädigung von Hepatozyten induziert⁷.

Im Verlauf der Fibrosierung kommt es zur Stimulierung der Proliferation von Fibroblasten und zu einer Änderung der Gefäßarchitektur. Durch diese Strukturänderungen wird u. a. der Metabolitentransport zwischen den Hepatozyten und dem sinusoidalen Blut gestört.

Diese Störungen der Leberfunktion können sich im Verlauf zu einer chronischen Zirrhose entwickeln.

1.4 Im Verlauf viraler Hepatitiden kommt es zur Leberzirrhose:

Die Virale Hepatitis kann durch die Infektion verschiedener Virustypen ausgelöst werden. Die Spezies HBV, HCV und HDV können in einer chronischen Infektion münden und zu einer chronischen Lebererkrankung führen. Die chronische Entzündung führt zu zirrhotischen Veränderungen und dadurch zu einer Reduktion der Leberfunktionen. Eine weitere Folge kann die Entwicklung maligner Lebertumore sein (HCC = **H**epatocellular **C**arcinoma).

Viral induzierte Leberschäden führen jährlich weltweit zu mehr als einer halben Millionen Todesfälle⁸. Dabei konnte z. B. für das Hepatitis B Virus bis dato keine Zytotoxizität nachgewiesen werden. Die Diversität der klinischen Symptome und hepato-

pathologischen Veränderungen ist bei einer Hepatitis B Infektion von der Intensität der Immunantwort des Wirts abhängig⁸.

Aktivierte CD8 und zytotoxische-T-Lymphozyten, CTL's, induzieren Apoptose infizierter Zellen oder sie rekrutieren antigenunspezifisch aktivierte Immunzellen, um ihre Zytotoxizität zu potenzieren.

1.5 Die Rolle von Zytokinen bei viral induzierten Lebererkrankungen:

Bei der komplexen durch eine HBV Infektion hervorgerufenen Immunreaktionen spielen diverse Zytokine als Mediatoren einer Kooperation der beteiligten Zelltypen eine wichtige Rolle. So scheint u. a. TNF bei der pathologischen Aktivierung von Makrophagen eine ursächliche Funktion zuzukommen^{9,10}. Bei Patienten mit chronischer Hepatitis B Infektion ist die Erkrankung mit erhöhten TNF Plasmakonzentrationen assoziiert, und die Infektion humaner Leberzelllinien mit HBV resultiert in einer Induktion der TNF Expression⁹.

Initial wurde TNF eine selektiv auf Tumorzellen wirkende apoptotische bzw. nekrotische Signalwirkung zugeschrieben¹¹. Das apoptose-induzierende Potential ist aber nicht auf Tumorzellen beschränkt, sondern auch Hepatozyten reagieren sensitiv in Hinblick auf TNF vermittelten Zelltod¹².

Inzwischen sind zahlreiche in-vitro und in-vivo Modelle etabliert worden, die zur genaueren Untersuchung der TNF vermittelten Hepatitis herangezogen werden können. Verschiedene Tiermodelle der experimentellen Hepatitis dienen der Aufklärung der molekularen Mechanismen, die in die Pathogenese der immunvermittelten Leberschädigung involviert sind. Eines der am besten charakterisierten Modelle ist die Concanavalin-A induzierte immunvermittelte Hepatitis.

1.6 Das Concanavalin-A Modell simuliert eine zytokinabhängige Hepatitis:

Concanavalin-A (ConA) ist ein pflanzliches Lektin der *Canavalia ensiformis*, bestehend aus 4 Untereinheiten. Es bindet Zuckerreste, u. a. α -D-Mannose und Methyl- α -D-Pyrranoside und wurde schon in den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts als Mitogen zur Stimulierung isolierter T-Lymphozyten charakterisiert. 1992 wurde mit der ConA induzierten T-Zell vermittelten Hepatitis in der Maus ein Modell etabliert, das für die Untersuchung immunvermittelter Leberentzündungen und der therapeutischen Beeinflussung dieser Erkrankungen ein geeignetes System darstellt ¹³. Die T-Zell Abhängigkeit des Modells wurde durch Experimente demonstriert, in deren Verlauf ConA injizierten Mäusen durch Cyclosporin-A oder FK506 immunsupprimiert wurden. Es zeigte sich, dass die Ausbildung einer ConA-Hepatitis unterbleibt ¹⁴.

Concanavalin-A hat eine hohe Bindungsaffinität zu den hepatischen Sinusoiden und führt dadurch zur Infiltration und Aktivierung mononukleärer Zellen in die Leber. An den initialen Schädigungsprozessen sind zunächst NKT- und später CD4⁺-Zellen beteiligt ^{14,15,16,17}. Der Autoimmunprozess resultiert in einem massiven Untergang von Hepatozyten. Durch Bestimmung der Serumaktivität spezifisch in der Leber exprimierter Enzyme, wie den Transaminasen GOT und GPT, ist eine schnelle und sichere Detektierung des induzierten Leberschadens durchführbar. Die Höhe der Transaminasenaktivität korreliert mit dem Ausmaß der Leberschädigung ¹³.

Die ConA induzierte Hepatitis ist assoziiert mit dem Anstieg der Serumkonzentrationen verschiedener Zytokine. Unter anderem IL1, IL2, IFN γ , GM-CSF und TNF sind zu verschiedenen Zeitpunkten der ConA-Hepatitis nachweisbar ^{13,18,19}.

Neben IFN γ vermittelt vor allem TNF die Initiierung der hepatozyten-schädigenden Ereignisse ²⁰. Eine Vorbehandlung ConA injizierter Mäuse, mit einem anti-TNF Antikörper verhindert die Ausprägung der Leberentzündung ¹⁸. Transgene TNF knockout Mäuse entwickeln keine ConA Hepatitis ¹⁹. Die TNF Rezeptoren TNFR-1 und TNFR-2 sind ebenfalls für die Ausprägung der ConA induzierten Hepatitis essentiell. So entwickeln sowohl TNFR-1 als auch TNFR-2 knockout Mäuse keine durch das Lektin induzierbaren Leberschäden ²⁰. Auch die TNF abhängige Stärke der JNK Aktivierung, einer weiteren Komponente des hepatozellulären TNF Signalwegs, korreliert mit dem Ausmaß der hepatozellulären Schädigung ²¹.

Die T-Zell Abhängigkeit und leberschädigende Wirkung von TNF im ConA Modell, machen das System zu einem geeigneten Modell der Untersuchung der Pathogenese humaner, immunvermittelter Hepatitiden.

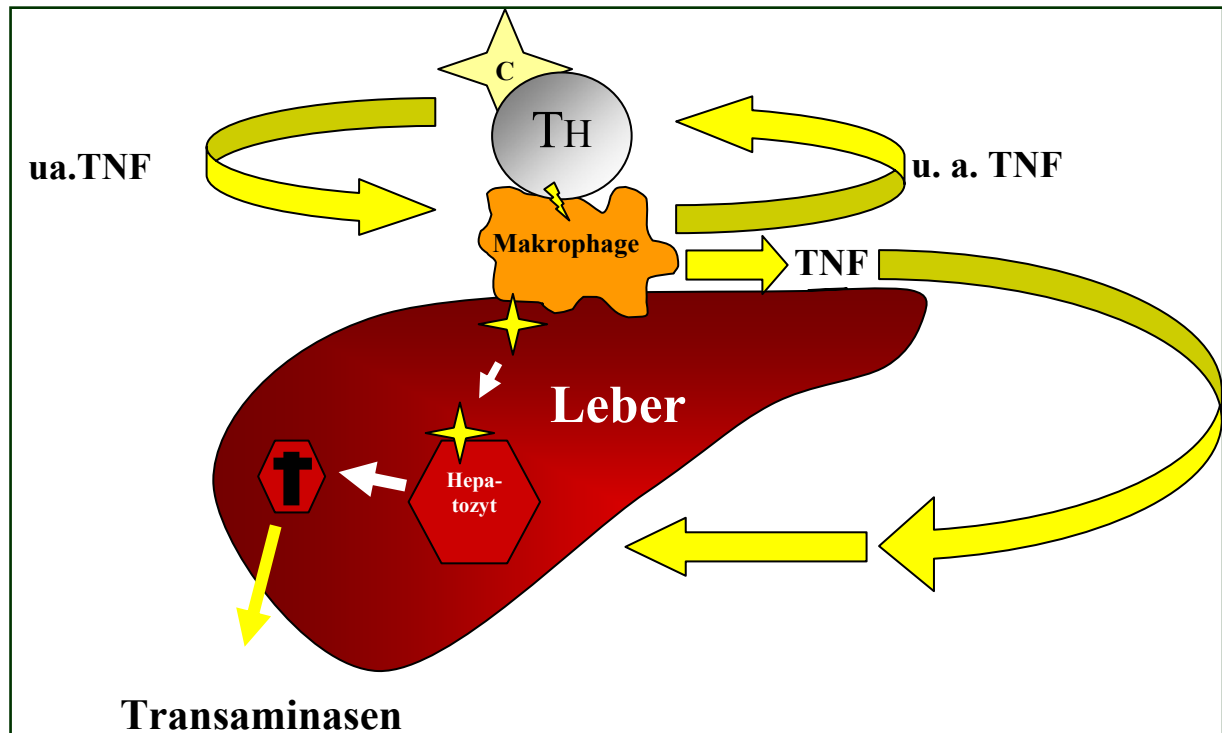


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der leberschädigenden Abläufe im ConA Modell:

ConA vermittelt die Rekrutierung und Aktivierung mononukleärer Zellen in Bereichen der Lebersinusoide. Es kommt zu einer Kaskade der Aktivierung zytotoxischer Zellen in der Leber. Verschiedene Zytokine werden dabei sezerniert. Bei den initiierten Leberschädigenden Ereignissen kommt unter anderem TNF eine essentielle Funktion zu. C: ConA, TH: T-Zelle.

Neben den Schädigungsmechanismen lassen sich am ConA Modell aber auch leberprotektive Signalwege untersuchen.

Im Gegensatz zu IFN γ und TNF scheint die Behandlung mit proinflammatorischen Zytokinen die ConA Hepatitis zu inhibieren. Für IL10 und IL6 sind protektive Effekte in diesem Modell beschrieben^{22,18}. Die genauen Mechanismen, die dem Schutz zugrunde liegen, sind allerdings weitgehend unbekannt.

Eine erhöhte IL6 Konzentrationen im Serum ist assoziiert mit einer Inhibition der TNF Expression in Monozyten²³. Dieser Mechanismus könnte einen Teilaspekt IL6 vermittelter Protektion wiedergeben.

Daneben zeigen neuere Ergebnisse, dass IL6 auch in Hepatozyten zellprotektive Signalwege aktivieren kann und mit der hepatozellulären Proliferation korreliert^{24,25}.

Die Ergebnisse in Bezug auf die IL6 vermittelten Protektionsmechanismen im ConA Modell lassen es sinnvoll erscheinen, eine genauere Betrachtung der IL6 abhängigen Signalwege in der Leber vorzunehmen. Insbesondere die Entwicklung therapeutischer Interventionsstrategien für humanpathogene Lebererkrankungen ist ein mögliches Ziel dieser Untersuchungen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Substanz ME3738 untersucht, die eine solche therapeutische Intervention möglich machen könnte.

1.7 ME3738:

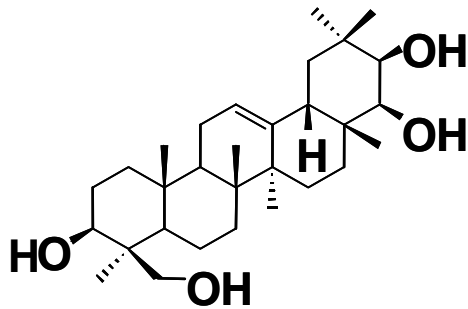
ME 3738 Applikation führt in verschiedenen Tiermodellen experimenteller Hepatitiden zu protektiven Effekten (Meiji Investigator Brochure 2001)¹²⁷.

Die Substanz der Firma *Meiji Seika Kaisha* ist zur Therapie akuter und chronischer Verläufe insbesondere viraler induzierter Hepatitis entwickelt worden. ME3738 Intervention reduziert in verschiedenen tierexperimentellen Modellen die Konzentrationen der Serumtransaminasen und induziert einen Schutz der Leber.

1.7.1 Pharmakologische Daten und chemische Struktur von ME3738:

ME3738 (22 β -Metoxyolean-12-ene-3,24(4 β)-diol) ist ein Derivat des aus der Sojabohne (*Glycine max*) isolierbaren Triterpens, Soyasapogenol A. Es handelt sich um eine weiße, kristallin-pulverförmige Substanz. ME3738 ist unlöslich in Wasser. In Alkoholen wie Ethanol, Methanol, oder organischen Lösungsmitteln hingegen schwach löslich. ME3738 gehört zu der Substanzgruppe der zyklischen, kondensierten Kohlenwasserstoffe, ist oleanen Charakters mit steroidähnlicher Struktur und hat ein Molekulargewicht von 472,74 g/Mol.

A)



B)

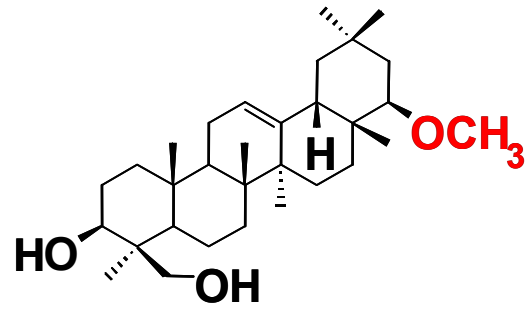


Abb. 1.2 :Die Struktur von Soyasapogenol A (A) und ME3738 (B)

Der hepatoprotektive Charakter der Substanz ist dabei nicht durch die Aktivierung von entzündungsinhibierenden Glukocortikoidrezeptoren verursacht. In-vitro Bindungsstudien zeigten keine Interaktion von ME3738 mit Testosteron-, Östrogen- oder Glukocortikoidrezeptoren.

In Tiermodellen chronischer Leberschädigung wie der chronischen Intoxikation mit CCL₄ reduziert ME3738 im Gegensatz zu Sojasapogenol A die Konzentration der Serumtransaminasen GOT und GPT. Zusätzlich ist die Bildung von nekrotischen Arealen und fibrosierten Bereichen in den Lebern behandelter Ratten signifikant reduziert (Investigator Brochure Meiji, 2001)¹²⁷.

Im Modell der α -Naphthylisothiocyanat induzierten Cholestase bewirkt ME3738 ähnliche Effekte. ME3738 verringert den Anstieg der Transaminasen- und Billirubinkonzentrationen im Serum (Investigator Brochure Meiji, 2001)¹²⁷.

In der im Rahmen dieser Dissertationsschrift durchgeführten Charakterisierung von ME3738 in der akuten ConA induzierten Hepatitis wurde nachgewiesen, dass die hepatoprotektiven Eigenschaften assoziiert sind mit veränderten IL6 Serumkonzentrationen. Aus diesem Grund wurden insbesondere die durch ME3738 induzierten IL6 abhängigen Signalwege in der Leber einer nachhaltigen Charakterisierung unterzogen.

1.8 Interleukin 6:

1.8.1 Klassifizierung:

Interleukin 6 (IL6) gehört zu einer Gruppe meist sekretierter Glykoproteine, den Zytokinen. Sie fungieren als chemische Mediatoren der Kommunikation zwischen Zellen, und binden spezifische, membranständige Rezeptoren an der Zielzelle^{26,27}. Durch die Bildung der Rezeptor-Ligandenkomplexe werden intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktiviert. Die Folgen Zytokin vermittelter intrazellulärer Ereignisse sind vielfältiger Natur. Sie können antiapoptotisch wirken, proliferations- oder differenzierungs-induzierend sein und spezifische Effektorfunktionen der Zielzelle steuern.

Anhand von Strukturmerkmalen und der Art der von ihnen gebundenen Rezeptoren werden Zytokine in 6 Gruppen eingeteilt (Abb. 1.3)

Gruppe	Mitglieder	Rezeptoren
1) Hämatopoetine	IL 2,4,7,9,15 IL 6,11, OSM, CNTF, CT1 IL3,5, GM-CSF IL10,IFN α , IFN β , IFN γ M-CSF	Zytokinrezeptorsuperfamilie Klasse1 Zytokinrezeptorsuperfamilie Klasse2 Tyrosinkinaserzeptor
2) EGF- Familie	EGF, TGF α	Tyrosinkinaserzeptor
3) β -Kleeblatt Familie	FGF α , FGF β , IL1	
4) TNF Familie	TNF α , TNF β , LT β	
5) Cysteinknoten Familie	NGF, TGF β , PDGF, VEGF	
6) Chemokine	IL8, MIP, MCP	Rhodopsin Superfamilie

Abb. 1.3 :Klassifizierung der bekannten Zytokine in 6 Familien (modifiziert nach Callard und Gearing 1994). Exemplarisch sind die Vertreter und der Rezeptortyp aufgeführt.

IL6 gehört zu der Gruppe der gp130 bindenden Mitgliedern. Weitere Vertreter sind Interleukin 11 (IL11), Leukemia-Inhibitory-Factor (LIF), Oncostatin-M (OSM), Ciliary-neutrophic-Factor (CNTF) und Cardiotrophin (CT1). Charakteristische Funktionsmerkmale dieser Gruppe sind ein pleiotropes und oftmals redundantes Wirkungs-

spektrum^{28,29,30,31}. So induzieren beispielsweise alle (außer CT-1) die Proliferation von Myelomazellen. Bis auf CT-1 und CNTF wird durch alle gp130 bindenden Zytokine die Bildung von Thrombozyten sowie die Proliferation hämatopoetischer Vorläufer angeregt.

1.9 Der IL6/gp130 Signalweg:

1.9.1 Struktur von gp130:

Der gp130 Rezeptor wird nahezu ubiquitär expremiert und besteht aus 918 Aminosäuren (AS). In der Maus kodiert ein Gen, bestehend aus 18 Exons, den gp130 Rezeptor³². Das Protein besteht aus einer extrazellulären Domäne von 597 AS, einer Transmembrandomäne von 22 AS und dem intrazytoplasmatischen Bereich (277 AS)^{33,34}. Die extrazelluläre Domäne setzt sich aus einer N-terminalen Immunglobulin-C2-Domäne, einer Zytokinrezeptorsuperfamiliedomäne und 4 Fibronectin Typ III Domänen zusammen. Die erste der Fibronectin Domänen beinhaltet die für Zytokinrezeptoren charakteristische WSXWS-Aminosäurefolge.

Gp130 selbst bindet nur OSM. Die Bindungsaffinität für andere Zytokine wird durch Komplexierung mit weiteren Rezeptortypen der gp130 Rezeptorfamilie erhöht.

Die mit gp130 interagierenden Zytokinrezeptoren können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe umfasst gp80 (IL6R), IL-11R α , CNTFR α und CT-1R und trägt ausschließlich zur Ligandenbindung, nicht aber zur Signaltransduktion bei.

Die zweite Gruppe ist sowohl für die Ligandenbindung als auch die Signaltransduktion verantwortlich. Ihr gehören der LIF-Rezeptor und der OSM-Rezeptor an.

Durch gp130 Homodimerisierung wird von den Zytokinen IL-6 oder IL-11 nach Ligandenbindung die intrazelluläre Signaltransduktion induziert.

Der IL6 aktivierte Rezeptorkomplex besteht aus einem Molekül IL6, gebunden an den IL-6-Rezeptor- α (gp80). Der Dimer rekrutiert zwei Moleküle membranständiges gp130³⁵ (Abb. 1.4).

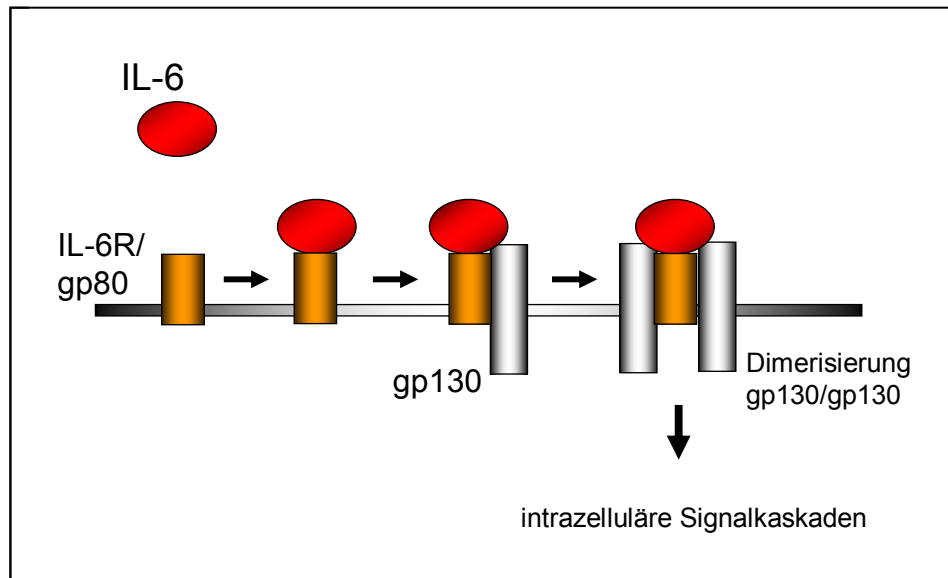


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der IL6 vermittelten Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden

Außer den membranständigen Varianten der gp130 assoziierten Zytokinrezeptoren existieren lösliche Formen dieser Proteine^{36,37}. Sie werden durch alternatives Spleißen oder mittels proteolytischer, posttranskriptioneller Modifikation generiert³⁸. Zellen, die nicht den membranständigen Rezeptor, sondern ausschließlich gp130 exprimieren, werden durch die lösliche Variante des gp80-Rezeptors (sgp80) für die IL-6 induzierte Signaltransduktion sensitiviert³⁸.

1.9.2 Die IL6 induzierte gp130 abhängige Signaltransduktion:

Durch aktiviertes gp130 werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden initiiert^{31,39}. Der Rezeptor besitzt keine Proteinkinaseaktivität, ist aber konstitutiv mit Kinasen der Janusfamilie (JAK) assoziiert. Die Janus Tyrosinkinasen werden durch gp130 Dimerisierung aktiviert. Es kommt zu deren Autophosphorylierung und schließlich zur Tyrosinphosphorylierung der zytoplasmatischen gp130 Domänen⁴⁰.

1.9.3 STAT Aktivierung:

Wird das Tyrosin Y767 phosphoryliert, bindet STAT3, und wird von den assoziierten Januskinasen phosphoryliert ⁴¹. STAT3 dissoziiert vom Rezeptor, homodimerisiert und transloziert in den Kern.

Auch STAT1 kann vom dimerisierten gp130 Rezeptor aktiviert werden und als STAT1 Homodimer bzw. als STAT1/STAT3 Heterodimer nukleär translozieren.

Die Spezifität der STAT Phosphorylierung wird durch die Identität der STAT bindenden Tyrosine am gp130 Rezeptor sichergestellt. Vier distal gelegene Tyrosine des zytoplasmatischen Bereichs von gp130 (Y915, Y905, Y814, Y767) erlauben die Aktivierung von STAT3. STAT1 bindet die Tyrosine Y915 und Y905 ⁴².

STAT abhängig wird die Transkription spezifischer Zielgene aktiviert, u. a. auch solche, die gp130 Signalaktivität inhibieren. Die Familie der Socs Proteine gehört zu dieser Gruppe. Sie inhibieren die katalytische Aktivität der Januskinasen ⁴³.

1.9.4 Der Ras-MAP-Kinase Signalweg:

Die Aktivierung des RAS-MAP-Kinase Signalweges wird durch Tyrosin Y759 des gp130 Rezeptors vermittelt ⁴⁴. Dort bindet nach Phosphorylierung die Phosphatase SHP-2 und rekrutiert die Proteine GRB2 und SOS. Nachfolgend wird inaktives Ras-GDP in die aktivierte Ras-GTP Form überführt ⁴⁴. Es folgt eine Kaskade von Aktivierungen. Ras-GTP interagiert mit der Serin/Threonin Kinase RAF, die ihrerseits MAPKK (MEK) phosphoryliert. MAPKK agiert sowohl als Tyrosinkinase, aber auch als Serin/Threoninkinase. Substrat ist die MAPK (ERK). ERK transloziert in den Kern und phosphoryliert dort Transkriptionsfaktoren. So gehören u. a. NF-IL6 oder c-Jun zu ihren Substraten.

Die durch die Zytokin-gp130 abhängige Aktivierung der STAT Transkriptionsfaktoren initiierten oder über die MAP-Kinase Kaskade vermittelten molekularen Ereignisse sind vielfältiger Natur.

1.10 IL6 bzw. gp130 knockout Mäuse dienen der Analyse des Signalwegs in Modellen der Leberschädigung.

1.10.1 Gp130 knockout Mäuse

Eine Möglichkeit die gp130 vermittelten Signale zu analysieren ist die Generierung und Charakterisierung von Zytokin- oder gp130 defizienten Mäusen.

Gp130-Defizienz ist letal. Die Tiere sterben abhängig vom genetischem Stammbhintergrund, zwischen Tag 12,5 p. c. und postnatal^{32,45, 46,47}.

Im Verlauf der Embryonalentwicklung kommt es in diesen Tieren zu einer verminderten Bildung von Zellmasse der fötalen Leber und einer reduzierten Anzahl hämatopoetischer Vorläuferzellen.

Die Embryonen haben eine erhöhte Anzahl von Osteoklasten, sowie eine reduzierte Knochenmasse⁴⁶. Ab Tag 16.5 p. c. tritt eine Hypoplasie des Myocards auf.

Die Architektur und Permeabilität der Plazenta in gp-130-defizienten Tieren ist gestört und die Zahl der Keimbahnzellen reduziert⁴⁷.

1.10.2 IL6 knockout Mäuse:

Bei IL-6 defizienten Tieren ist die Anzahl von peripheren T-Zellen und Thymozyten um 30% reduziert⁴⁸. Die Enddifferenzierung von T Zellen zu TH1 bzw. TH2 Zellen ist zugunsten des TH2-Typs verschoben^{49,50}. IL-6 knock-out Tiere sind anfällig gegenüber viralen oder parasitären Infektionen^{48, 49, 50,51}.

Darüber hinaus ist die Chemokinsynthese und die Rekrutierung bzw. Akkumulation von Leukozyten an Entzündungsherden verzögert⁵². Nach Terpinintoxikation ist keine Synthese von Akut Phase Proteinen detektierbar⁴⁸.

1.11 Die Akut Phase Reaktion:

Insbesondere die gestörte Expression von Akut-Phase Proteinen in IL6 bzw. gp130 defizienten Mäusen wurde im Verlauf der vorliegenden Dissertationsschrift im Rahmen der ConA induzierten Hepatitis einer eingehenden Untersuchung unterzogen. ConA induziert eine inflammatorische Gewebsdegeneration der Leber. Entzündliche Ereignisse lösen systemische Reaktionen wie Fieber, Anorexie, Kachexie oder Hypoglykämie aus. Eine weitere wichtige Folge ist die hepatozelluläre Synthese und Sezernierung von Akut Phase Proteinen (APP) ^{53,54}. Entsprechend der Zielsetzung Störungen des Organismus schnell und massiv entgegenzuwirken sind die Funktionen der APP's vielfältiger Natur ⁵⁵.

Die Funktionen der Akut Phase Proteine

- 1) Pathogenabwehr: z.B. C-reaktives Protein
- 2) Wundheilung: z.B. Fibrinogen, SAP
- 3) Proteaseinhibition: z.B. α 1-Antitrypsin (α 1-proteinase inhibitor)
 α 1-Antichymotrypsin, SAP, SAA
- 4) Schutz vor reaktiven Radikalen: z.B. Ceruloplasmin, Hemopexin, Haptoglobin.

Die Synthese von Akut Phase Proteinen wird durch Zytokine stimuliert. Die Regulation erfolgt vorwiegend transkriptionell. Besonders wichtig sind gp130-abhängige Zytokine. Zusätzlich können IL-1, TNF und Kortikosteroide beteiligt sein ^{56,57}.

Ein Beispiel für ein komplex reguliertes Akut Phase Protein ist SAA2. Es wird im Verlauf der Akut Phase Reaktion in seiner Expression in hohen Konzentrationen ins Serum sezerniert.

1.11.1 SAA2:

Sowohl IL1, TNF als auch IL6 sind an der transkriptionellen Regulation von SAA beteiligt ⁵⁸. Das humane Genom kodiert 4 SAA Proteine. SAA1 und SAA2 liegen Kopf an Kopf im SAA Gencluster. Außerdem liegen das Pseudogen SAA3 und das ubiquitär expremierte SAA4 in diesem Genlokus ⁵⁹.

Der SAA Promotor enthält u. a. NFkB-, C/EBP- und NF-IL6 sensitive regulatorische Elemente ⁶⁰. Alle diese Elemente werden durch die gp130 Signaltransduktion beeinflusst.

SAA1 und SAA2 sind in eine Reihe immun-modulierender Prozesse involviert. So beeinflussen SAA1 und SAA2 die Cholesterol Sezernierung durch Monozyten und damit die Cholesterolkonzentration in Entzündungsherden ⁶¹. Die Chemotaxis von Monozyten und T-Zellen wird durch ins Serum sezerniertes SAA1 und SAA2 gesteuert; sie fungieren als Modulatoren der extrazellulären Matrix, indem sie u. a. als autokrine Induktoren von Kollagenase agieren ^{62,63}.

Die Zytokin abhängige transkriptionelle Regulation und die immunmodulierende Aktivität der SAA Proteine machen eine genauere Betrachtung der SAA Expression in den in dieser Dissertation untersuchten Fragestellungen sinnvoll.

1.12 Ziel der Arbeit:

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte untersucht werden, ob das Saponinderivat ME3738 im ConA Modell der experimentellen Hepatitis eine protektive Wirkung zeigt.

Um die Grundlagen zu einer möglichen therapeutischen Intervention bei verschiedenen Lebererkrankungen zu schaffen, standen die molekularen Mechanismen dieses potentiellen Schutzes im Fokus der Untersuchungen.

Tiere, die für Komponenten des IL6/gp130 Signalweges deletiert oder modifiziert waren, wurden im ConA- Hepatitis Modell charakterisiert. Somit sollten neue Erkenntnisse über die IL6/gp130 abhängigen Mechanismen in diesem Modell gewonnen werden.

Mittels der Aufklärung und Charakterisierung der Wirkung einer ME3738 Intervention in IL6 defizienten und Hepatozyten spezifische gp130 knockout Tieren sollte eruiert werden, ob über diesen Signalweg in-vivo Leberschutz vermitteln werden kann.

2 MATERIAL UND METHODEN:

2.1 Medium für Bakterien:

LB-Medium:

ad 1000 ml H₂O:

10 g Bacto-Pepton, 5 g Bacto-Hefe-Extrakt, 10 g NaCl, das Medium wurde autoklaviert und zur plasmidspezifischen Selektion wurde vor der Beimpfung das entsprechende Antibiotikum beigefügt.

LB-Agarplatten:

1 l LB-Medium wurde mit 15 g Ager versetzt und autoklaviert. Zur Selektion transformierter Kone wurde das erforderliche Antibiotikum nach Abkühlung auf unter 60°C zugefügt und der Ansatz in Petrischalen verteilt. Die Platten wurden nach dem Abkühlen bei 4°C gelagert.

2.2 Verwendete Bakterienstämme:

JM 109: F⁺traD36lacIq Δ(lacZ)M15 proA+B+/e14-(McrA-) Δ(lac-proAB) thi gyrA96 (Nal^r) endA1 hsdR17 (rK- mK+) relA1 supE44 recA1

MC 1061/P3:F- araD139 Δ(ara-leu)7696 galE15 galK16 Δ(lac)X74 rpsL (Str^r) hsdR2 (rK- mK+) mcrA mcrB1(Invitrogen). Ein E.coli –Stamm, der das P3-Plasmid trägt. Es codiert das tRNA-Suppressor F-Gen (SupF); damit wird die Replikation von Plasmid-DNA unterstützt.

One-Shot-Zellen wurden dem pCR-2.1-Vektor-Kit der Fa. Invitrogen entnommen

2.3 Verwendete Plasmide:

2.3.1 pBS (Fa. Stratagene):

Klonierungsvektor (mit MCS (multiple cloning site), Ampicillinresistenzgen und „blau-weiß Selektionsmöglichkeit“).

2.3.2 pGEM-T-Vektor: (Fa.Promega):

Vektor zur Klonierung von PCR Fragmenten. Der Vektor ist linearisiert. Enthält überhängende 3' Thyminnukleotide zur effizienten Klonierung von Fragmenten, die überhängende Adeninnukleotide aufweisen.

2.3.3 pRS1-SAA-2:

Der pRS1 Vektor enthält eine 1,4 kb große cDNA des SAA-2 Gens. Das SAA-2 Hybridisierungsfragment wurde mit EcoRI und PstI aus dem Plasmid herausgeschnitten und für Northern-Blot-Analysen eingesetzt.

2.3.4 pBS-Hemopexin:

Bluescript-Plasmid, das ein ca. 700 bp umfassendes cDNA-Fragment des humanen Hemopexins enthält. Das Hemopexin-cDNA-Fragment lässt sich mit Hind3 exzisieren und wurde für die Herstellung der Hybridisierungssonde in Northern-Blot-Analysen eingesetzt. Das Plasmid kodiert u. a. ein Tetracyclin-Resistenzgen.

2.3.5 pGEM-T-Vektor-IL6:

Dieser Vektor wurde zur Generierung eines IL6-Northern-Blot Fragments kloniert. Die verwendeten Primer flankieren einen Sequenzbereich im 3. Exon des IL6 Gens. Mittels einer RT-PCR wurde ein 278bp großes DNA Fragment synthetisiert. Als Vorlage diente aus Lebergewebe isolierte RNA LPS stimulierter Mäuse. Das im Agarose Gel separierte DNA Fragment wurde aufgereinigt und in den pGEM-T-Vektor kloniert. Nach Transformation kompetenter Bakterien wurde ein Einzelklon mittels Kultivierung einer Flüssigkultur amplifiziert und die Plasmid DNA isoliert.

Die gewonnene Plasmid DNA wurde sequenziert. Die Sequenz wurde mit dem Programm *DNA-Star* in Bezug auf Homologie zur IL6 Sequenz überprüft.

Zur Generierung des Northern-Blot Fragments wurde das ca. 300bp große Insert mit der Restriktionsendonuklease EcoRI aus dem Vektor entfernt und im Agarose Gel von den Vektorbereichen getrennt und isoliert.

2.3.6 pBS Socs3:

Der Vektor enthält ein ca. 1000bp großes cDNA Fragment des Gens SOCS3. Durch eine Restriktionshydrolyse mit EcoRI kann das Insert aus dem Vektor entfernt werden und für die Generierung eines radioaktiv markierten Northern-Blot DNA Fragments eingesetzt werden.

2.4 Rekombinante Proteine:

2.4.1 rhIL-6:

Das rekombinante humane IL6 wurde freundlicherweise von Prof. C. Heinrich vom Universitätsklinikum Aachen, Abt. Biochemie, zur Verfügung gestellt.

Rekombinantes humanes IL-6 wurde in *E. coli* produziert und wie beschrieben präpariert⁶⁴.

2.5 Chemikalien:

2.5.1 Liste der verwendeten Chemikalien:

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Merck
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	Roth
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	Gibco
Agarose (Electrophoresis grade)	Gibco
Agarose (Sea Plaque)	Gibco
Ammoniumacetat	AppliChem

Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Sigma
Aprotinin	Sigma
ATP	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma
Agar noble	Gibco
Hefeextrakt	Gibco
Bacto-Tryptone	Gibco
BES (N,N-bis (2-Hydroxyethyl)-2 aminoethansulfonsäure)	Sigma
Bromphenolblau	Serva
BSA (Bovines Serumalbumin)	Serva
Calciumchlorid	Merck
Cäsiumchlorid	Sigma
Carboxymethylzellulose	Sigma
Chloroform	J.T.Baker
Concanavalin-A	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
dNTPs	Appllichem
EDTA (N,N;N',N'-Ethylendiamintetraacetat)	Merck
EGTA (Ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat	Sigma
Essigsäure	J.T.Baker
Ethanol	J.T.Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerol	Serva
Glycylglycin	Sigma
Glycin	AppliChem
Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure)	ICN
Isopropanol	J.T. Baker
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhexacyanoferrat (II)	Merck
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Merck
Lysozym	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck

Magnesiumsulfat	Merck
Magermilchpulver	Serva
ME3738	Meiji
Methanol	J.T.Baker
MOPS (3-(N-Morpholin)	Sigma
Natriumhydroxid	Merck
Natriumacetat	AppliChem
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat	Sigma
Natriumfluorid	Merck
Natriumvanadat	Merck
Nonidet-P-40 (NP-40)	Sigma
ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid)	Sigma
PBS (phosphate buffered saline)	Gibco
Pefabloc	Boehringer
Poly(dI-dC)-Poly(dI-dC)	Pharmacia
Polyethylenglycol 8000 (PEG-8000)	Sigma
Roti-Blue	Roth
Rotiphenol/Chloroform	Roth
RPMI 1640	Gibco
Saccharose	Merck
Salzsäure	Riedel-de- Häen
Spermidin	Sigma
Spermin	Sigma
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma
TLCK (N-p-Tosyl-L-Lysin-Chloromethylketon)	Sigma
TPCK (N-Tosyl-L-Phenylalanin-Chloromethylketon)	Sigma
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	AppliChem
Triton-X-100	Sigma
Tryptose phosphate broth	Gibco
Tween 20	Serva
X-gal (5-Bromo 4-chloro 3-indolyl-Galactosid)	Sigma
Xylencyanol	Merck

2.5.2 Radiochemikalien:

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham bezogen.

^{32}P - γ -ATP für die Markierung von Oligonukleotiden

^{32}P - α -dCTP für den Einbau beim Random-Priming für die radioaktive Markierung von DNA-Sonden

2.6 Molekulargewichtsmarker:

2.6.1 DNA-Marker:

1kb-Leiter (Fa. Gibco BRL)

100bp Leiter (Fa Gibco BRL)

2.6.2 Protein-Marker:

Prestained SDS-PAGE-Standard, Low-Range (Fa. BioRad)

2.7 Enzyme:

DNase I, RNase-free (Fa. Boehringer, Mannheim)

Restriktionsendonukleasen (Fa. Biolabs, New England)

T4-Kinase (Polynukleotid-Kinase, Fa. Biolabs)

2.8 Antikörper:

Anti-STAT3-Antikörper (Fa. Santa Cruz)

Phospho-specific-STAT3-Antikörper (Fa. Biolabs)

Anti-STAT1-Antikörper (Fa. Santa Cruz)

Phospho-spezifischer STAT1-Antikörper

Anti-mouse-Peroxidase-conjugated-Antikörper (Fa. Dianova)

Anti-p50-Antikörper (Fa. Santa Cruz)

Anti-p65-Antikörper (Fa. Santa Cruz)

Anti cFos Antikörper (Fa. Clontech)

Anti SAA2 Antikörper (Fa. Biosource)

2.9 Oligonukleotide:

STAT Konsensusoligo für Gel-Retentionsanalysen:

5'-GTG CAT **TTC CCG TAA** ATG TTG TCT ACA-3'

5'-CAC GTA **AAG GGC ATT** TAC AAC AGA TGT-3'

NFkB Oligo für Gel-Retentionsanalysen:

5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'

5'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-3'

IL6 Klonierung:

5'-CTTCCATCCAGTTGCCTTCTTG-3'

5'-GGTAGCATCCATCATTCTTTGTA-3'

Cre Rekombinase Primer:

5'-TAA TCG CCA TCT TCC AGC AG-3'

5'-CAA TTT ACT GAC CGT ACA C-3'

pLox Primer:

5'-GGC TTT TCC TCT GGT TCT TG-3'

5'-CAG GAA CAT TAG GCC AGA TG-3'

gp130 Deletionsprimer:

5'-CAG GCA GCT TTA TGT TGG AAG T-3'

5'-CAG GAA CAT TAG GC AGA TG-3'

gp130 Southern Fragment:

5'-CAG GCA GCT TTA TGT TGG AAG T-3'

5'-CTC AAG CAA CCT GTC AAA GAT G-3'

2.10 Sonstige Materialien:

Zentrifugenröhrchen, Ultra-Clear™ (Fa. Beckman)
ECL-Detection Kit (Fa. Amersham)
3MM Filterpapier (Fa. Whatman)
Filmkassetten mit Verstärkerfolien (Fa. Kodak)
Fotofilm Ektachrom 400/100 (Fa. Kodak)
Grundausrüstung für Tieroperationen (MHH)
Homogenisator und Homogenisierungskolben (Fa. Braun)
Kulturplatten (Bakterien) (Fa. Greiner)
Nylon-Membran für Northern- (Fa. NEN-Life Science) und Western- (Fa. Millipore)
Blot-Analysen
Röntgenfilme (Fa. Amersham)
Zentrifugenröhrchen, steril (10 ml) (Fa. Sarstedt)
Zentrifugenröhrchen, steril (5 ml) (Fa. Sarstedt)

2.11 Geräte:

Abi-Prism-310-Genetic-Analyser
Elektrophorese-Apparaturen (Fa. Von Keutz, Fa. Pharmacia Biotech, Fa. Serva (Blue Line))
β-Counter (Fa. Berthold)
Cryostat Microm HM 500 OM (Fa. Omega)
Heizblock (Fa. Eppendorf)
Luminometer (Fa. Berthold)
Slot-Blotter (Fa. Schleicher & Schuell)
Spannungsgeräte (Power-Supply) (Fa. Pharmacia Biotech)
Spektralphotometer Lamda-Scan 200e (Fa. MWG)
Tank-Blot-Apparat (Fa. Bio-Rad)
Ti-70-Rotor und SW 28.1-Swinging-Bucket-Rotor (beide Fa. Beckman)
Vortex-Mixer (Fa. Omnilab)
Tischzentrifuge (Fa. Eppendorf)
Laborzentrifugen 2 K 15 (Fa. Sigma) und GS-6G (Fa. Beckman)

Ultrazentrifuge (Fa. Beckman)

UV-Stratagene 1800 Crosslinker (Fa. Stratagene)

Ultraschall Gerät (Fa. Biorad)

2.12 Tierexperimentelle Methoden:

2.12.1 Injektionen:

2.12.1.1 Concanavalin-A Injektion:

Die Injektion von ConA erfolgt intravenös.

Den Tieren wird für mindestens 12h das Futter entzogen, die Injektionen finden zwischen 9 und 11 Uhr statt.

- Das Gewicht zu injizierender Tiere wird bestimmt.
- Die Tiere werden für die Injektion in eine Arretiervorrichtung (Plexiglasröhre) geführt.
- Der Schwanz der Mäuse wird mit warmen Wasser erwärmt.
- Das Injektionsvolumen der ConA Lösung ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wird errechnet und durch eine Kanüle möglichst geringen Durchmessers in eine der 4 Schwanzvenen injiziert. Kontrolltieren wird ein entsprechendes Volumen 0,9% NaCL injiziert.

Concanavalin-A Lösung ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

50mg Concanavalin-A (Sigma-Aldrich)

50ml 0,9% NaCL. ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

2.12.1.2 ME3738 Injektion:

Die Injektion von ME3738 (10mg/ml) erfolgt subkutan. Die Substanz wird in den Rücken auf Höhe der Leber injiziert. Den Tieren wurde 40mg/kg ME3738 injiziert.

Im Rahmen der ConA Therapie erfolgten die Me3738 Injektionen 14 Stunden und 2h vor der ConA Applikation.

Die Herstellung einer ME3738 Injektionslösung (10mg/ml):

- Die Me3738 Lösung wird direkt vor Injektion in einem sterilen Glasgefäß hergestellt.
- Eine entsprechende Menge ME3738 wird abgewogen

- Mit sterilem 0,5% CMC (Carboxymethylzellulose) wird die Konzentration auf 10mg/ml eingestellt.
- Das Gemisch wird durch dreimaliges Sonifizieren (Ultraschall) für 3 min. (100% Leistung) in einen suspensionsähnlichen Zustand gebracht.
- Direkt nach der Herstellung wird ME3738 den Mäusen subkutan injiziert

2.12.1.3 Injektion von humanen rekombinanten IL6:

Das rekombinante IL6 wurde freundlicherweise von Prof. C. Heinrich zur Verfügung gestellt.

Es wurde pro Tier 10µg rIL6 intraperitoneal injiziert. Die Injektion erfolgte im Rahmen der ConA Präventionstherapie 3h vor ConA Injektion.

2.12.2 Retroorbitale Blutentnahme:

Die Blutabnahme erfolgt am betäubten Tier. Die Tiere werden ca. 30 s einer Ätheratmosphäre ausgesetzt. Mit einer Glaskanüle wird die Vene vor dem rechten Auge perforiert und eine möglichst geringe Menge Blut entnommen.

2.12.3 Tiertötung und Gewebeentnahmen:

Die Tiertötung erfolgt am betäubten Tier. Alle Tiere werden durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet.

Die entsprechenden Gewebe werden entnommen und in 4°C kalten PBS zwischengelagert (für Kernproteinextraktionen), oder in flüssigen Stickstoff gefroren (für RNA Biopsien und Biopsien für die Anfertigung von Kryoschnitten).

2.13 DNA-Präparation und -Analyse:

2.13.1 Agarose-Gelelektrophorese:

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten und genomischer DNA erfolgte durch Elektrophorese in einem Agarose-Gel (0,8 – 1,5% Agarose, 1 x TAE; 0,5 µg/ml Ethidiumbromid). Die DNA-Proben werden vor dem Auftrag mit 0.1 Volumen 10 x Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm mit TAE als Laufpuffer.

10 x DNA-Ladepuffer:

10 % (w/v) Ficoll 400 in Aqua dest.

0.25 % Orange G (w/v)

2.13.2 Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren:

2.13.2.1 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen:

Die Subklonierung von DNA-Fragmenten erfordert die Linearisierung des Klonierungsvektors. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen, die in der Lage sind spezifische Sequenzen auf der DNA zu erkennen, findet eine Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen statt. Zur enzymatischen Hydrolyse wird die DNA mit der jeweiligen Endonuklease, in dem für das Enzym spezifischen Reaktionspuffer und bei einer für die enzymatische Reaktion optimalen Temperatur von 37°C für ca. 2 Stunden inkubiert. Anschließend wird die Vollständigkeit der DNA-Hydrolyse auf einem Agarose-Gel kontrolliert.

2.13.2.2 Dephosphorylierung von Vektoren:

Um eine Religation des Vektors zu unterbinden, wird der linearisierte Vektor dephosphoryliert.

Der linearisierte Vektor wird zur Entfernung der Restriktionsendonukleasen und deren Puffer einer EtOH-Fällung unterzogen. Die präzipitierte DNA wird in sterilem H₂O aufgenommen.

Reaktionsansatz für die Dephosphorylierung des Vektors

x µl Vektor DNA [1µg/µl]

x µl H₂O

10 µl Puffer [10x]

1 µl Restriktionsenzym [5-20U/µl]

100µl Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wird 30 min. bei 37°C inkubiert. Die Enzyminaktivierung erfolgt durch 10 min. Inkubation bei 65°C.

2.13.2.3 Ligation:

Die Ligation von DNA-Fragmenten in dephosphorylierte Plasmidvektoren wurde unter Verwendung der T4-DNA Ligase durchgeführt. Die eingesetzten Mengen an Plasmidvektor und DNA-Fragment sollten in einem äquimolaren Verhältnis stehen und zwischen 20 und 200ng betragen.

Reaktionsansatz für die Ligation eines DNA-Fragments in dephosphorylierten Vektor:

x µl DNA Fragment

x µl Vektor DNA

x µl H₂O

1 µl T4 DNA-Ligase Puffer [10x]

1 µl T4 DNA Ligase [5U/µl]

10 µl Endvolumen

Auf einem Agarose-Gel werden die Konzentrationen der zu klonierenden DNA und des Vektors überprüft.

Der Reaktionsansatz wird entweder 1 Stunde bei RT oder bei 16°C ü.N. inkubiert.

Der Ligationsansatz wird direkt zur Transformation kompetenter E. coli-Bakterien verwendet.

2.13.2.4 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E. coli-Bakterien:

Als Voraussetzung für die Klonierung mit Plasmide ist die Transformation der Empfängerzelle mit rekombinanten DNA-Molekülen.

Transformations-kompetente E. coli Zellen wurden mittels der CaCl₂ - Methode hergestellt.

2.13.2.5 Herstellung kompetenter E. coli Zellen (XL Blue 1):

- Ausgehend von einer ü.N.-Kultur von XL Blue 1-Zellen werden 40 ml LB-Medium mit 40 µl Zellsuspension angeimpft.
- Die Kultur wird bis zu einer OD von 0,2-0,4 bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.
- Danach werden die Bakterien auf Eis abgekühlt und bei 4000 U/min für 5 min zentrifugiert.
- Die sedimentierten Bakterien werden in 20 ml eiskalter, 50mM, CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Es wird erneut zentrifugiert und die Bakterien werden in 4 ml, 50mM, CaCl₂-Lösung resuspendiert.

2.13.2.6 Transformation:

Während der Transformation nehmen 100 µl kompetente Zellen bis zu 0.1 µg Plasmid-DNA auf. Durch die Aufnahme von Plasmiden erlangen die Bakterien Antibiotikaresistenz. Somit ist die Möglichkeit der Selektion transformierter Zellen auf Antibiotika-enthaltenden LB-Agarplatten gegeben.

- 100 µl kompetente XL-Blue-Zellen werden mit 5 µl des Ligationsansatzes 30 min. auf Eis inkubiert.
- In einem auf 42°C vorgewärmten Wasserbad werden die Zellen für 90 sek. einem Hitzeschock ausgesetzt, der die Aufnahme von Plasmiden erleichtert.
- Anschließend werden die Zellen auf Eis gestellt. 800 µl kaltes LB-Medium wird hinzugefügt und es wird eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert.
- Die Zellsuspension wird auf LB-Agarplatten mit Ampicillinzusatz ausgestrichen und ü.N. im 37°C-Brutschrank belassen.
- Aus den gewachsenen Kolonien kann nun Plasmid-DNA isoliert werden.

2.13.3 Isolierung von Plasmid DNA:

2.13.3.1 DNA-Minipräparation:

Aus einer 2 ml Übernachtskultur eines rekombinanten Klons wird die Plasmid-DNA isoliert. Diese Methode liefert 15-30 µg DNA.

- Die Zellsuspension wird 1 min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment wird in 100 µl gekühltem GET-Puffer resuspendiert und 5 min. auf Eis inkubiert.
- Es werden 200 µl frisch angesetzter Lysispuffer (Lösung 2) hinzugefügt, die Probe kurz durchmischt, und zur weiteren Inkubation 5 min. auf Eis belassen.
- Nach der Zugabe von 150 µl gekühlter Hochsalzlösung (Lösung 3) wird kurz durchmischt und 10 min. auf Eis inkubiert.
- Die gefällten Zelltrümmer, genomische DNA und Proteine werden 10 min. zentrifugiert und der Plasmid enthaltene Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt.
- Es folgt eine Isopropanol-Fällung.
- Anschließend wird die Plasmid-DNA in 20 µl H₂O resuspendiert.

Zur DNA Minipräparation genutzte Lösungen:

GET –Puffer: 50 mM Glukose

Lösung 1: 10mM EDTA/25mM Tris-HCl pH 8,0

Lösung 2: 0,2 M NaOH/1% SDS

Lösung 3: 3 M Kaliumacetat

2.13.3.2 Plasmid DNA-Maxipräparation:

Werden größere Mengen von Plasmid-DNA benötigt, so erfolgt die DNA-Isolierung mit dem Maxi-Plasmid-Kit der Fa. Qiagen. Hier werden die Bakterien nach der Kultivierung zentrifugiert und unter alkalischen Bedingungen lysiert.

Die freigesetzte DNA wird über eine Anionenaustauscher-Säule von den übrigen Bakterienbestandteilen getrennt.

Nach Fällung der DNA mit Isopropanol wird das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und in Aqua dest. resuspendiert.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte am Spektralphotometer.

Dabei kommt folgende Formel zur Anwendung:

A₂₆₀ von 1 = 50 µg/ml.

Das detaillierte Vorgehen ist dem „User Manual“ der Firma *Qiagen* zu entnehmen.

2.13.4 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien:

- Mindestens 4 Wochen alten Mäusen werden ca. 0,5 cm des Schwanzes unter Ether-Narkose reseziert.
- Über Nacht wird das Gewebe in 750 µl Lysepuffer bei 55°C inkubiert.
- Das Lysat wird gemischt und mit 250 µl gesättigter Natriumchloridlösung versetzt. Durch das Natriumchlorid wird die DNA ausgesalzen.

- Nach 5 min. Inkubation im Schüttler werden die Ansätze 10 min. bei 15000 rpm. zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgenommen und die genomische DNA wird mit 500 µl I-sopropanol präzipitiert.
- Das DNA-Pellet wird mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet.
- Die DNA wird in 100 µl dH₂O resuspendiert.

Gewebe-Lysepuffer:

20 mM Tris-HCl, pH 8,0
100 mM EDTA, pH 8,0
100 mM NaCl
1 % 20 % SDS
0,5 mg/ml Proteinase-K

2.13.5 Isolierung genomischer DNA aus Mausleberbiopsien

Die Isolierung von genomischer DNA aus der Leber erfolgt entsprechend dem Protokoll für DNA aus Mäuseschwänzen. Für die Isolierung werden ca. 50 mg der Leber eingesetzt.

2.13.6 Alkalischer Southern-Blot

Bei diesem Verfahren wird die DNA in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Moleküle werden aus der Gelmatrix auf eine Trägerschicht aus Nitrocellulose oder Nylon transferiert und nachfolgend immobilisiert.

- 10 – 50 µg genomischer DNA werden mit 50–100 Units eines geeigneten Restriktionsenzym 12 – 18 h bei der für das jeweilige Restriktionsenzym optimalen Temperatur inkubiert und in einem 1%-tigem Agarose-Gel aufgetrennt.

- Das Gel wird 15 min. in 0,25 HCl inkubiert und anschließend mit Aqua dest. gespült.
- Zur Denaturierung der DNA wird das Gel 2 x 15 min in Transferlösung geschwenkt und anschließend mittels Kapillarblot auf Nylonmembranen (Gene-Screen+, Fa. NEN Life Science) transferiert.
- Nach ca. 12 h wird die Membran 2 x 15 min. in Neutralisierungspuffer inkubiert.
- Anschließend wird die DNA auf der Membran durch UV-Crosslinking (Stratalinker, Fa. Stratagene) immobilisiert.
- Die Membran wird für 30 min. bei 60°C in einem Hybridisierungsofen mit Hybridisierungslösung (Church Lösung) prähybridisiert.
- Das radioaktiv markierte DNA Fragment wird denaturiert (Erhitzen für 10 min bei 95°C) und anschließend zur Hybridisierungslösung beigefügt.
- Die Hybridisierung erfolgt für ca. 18 h bei 55°-65°C.
- Zur Reduzierung des Hintergrundsignals wird die Membran 1 h mit 5 x SSC/0,1 % SDS und anschließend mit 2 x SSC/0,1 % SDS bei 55-65°C gewaschen.
- Die Detektion erfolgt durch Exposition auf einem Röntgenfilm bei -80°C.
- Um quantitative Resultate zu erhalten, wird alternativ ein Bio-Imaging-Analyser (Fuji Bas 1000, Fa. Fuji Photo Film Co.) und PC-Bas Software (PCBAS Version 2.09f, Fa. Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH) verwendet.

20 x SSC ad 1000ml:

175.3 g (3 M) NaCl
88.2 g (0.3 M) Na3Citrat * 2 H2O
den pH auf 7.0 mit 1 M HCl einstellen

Church-Lösung, ad 1000 ml:

250 ml 1 M NaPO4, pH 7.2
350 ml 20%-igen SDS-Lsg.
20 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0

2.13.7 Polymerasekettenreaktion (PCR):

Die PCR wird präparativ (Gensonden, Fragmente zur Klonierung) und analytisch (Genotypisierung von Mäusen, Detektion von Cre-katalysierter Rekombination) eingesetzt.

Um DNA-Fragmente zu amplifizieren wird in der Regel folgender Reaktionsansatz verwendet:

- 5.0 µl 10 x Reaktionspuffer (GibcoBRL)
- 1.5 µl 50 mM MgCl₂ (GibcoBRL)
- 4.0 µl dNTP Mix (je 2.5 µM; GibcoBRL)
- 1.0 µl sense Primer (20 µM)
- 1.0 µl antisense Primer (20 µM)
- 0.5 µl *Thermus aquaticus* DNA Polymerase (5 U/µl; GibcoBRL)
- 1.0 µl DNA (ca. 50 ng)
- 36 µl H₂O

Auf einem Thermoblock (Biometra) wird dann in 30 bis 40 Zyklen folgendes Temperaturprofil durchlaufen:

- 1 min 94°C Denaturierung
- 1 min x °C Annealing
- 2 min 72°C Primer-Elongation

Um das Cre-Rekombinase-Gen bei den Mäusen zu detektieren wird folgende Primerkombination gewählt:

Sense-Primer: 5'-TAA TCG CCA TCT TCC AGC AG-3'
Antisense-Primer: 5'-CAA TTT ACT GAC CGT ACA C-3'

Bei positivem Nachweis erhält man eine 1 kb große Bande.

Um den pLox-Status des gp130 Gens zu analysieren, wird folgende Primerkombination gewählt:

Sense-Primer: 5'-GGC TTT TCC TCT GGT TCT TG-3'

Antisense-Primer: 5'-CAG GAA CAT TAG GCC AGA TG-3'

Bei pLox flankiertem Allel wird eine 700 bp Bande nachgewiesen, ansonsten eine ca. 600bp Wildtypbande.

Zum Nachweis einer Cre-Rekombinase vermittelten Deletion des Exon 16 des gp130 Gens wird folgende Primerkombination gewählt:

Sense-Primer: 5'-CAG GCA GCT TTA TGT TGG AAG T-3'

Antisense-Primer: 5'-CAG GAA CAT TAG GC AGA TG-3'

Eine Deletion wird durch eine 700 bp Bande nachgewiesen; die Wildtyp Bande ist ca. 1kb groß.

Zur Generierung einer gp130 Sonde werden folgende Primer verwendet:

Sense-Primer: 5'-CAG GCA GCT TTA TGT TGG AAG T-3'

Antisense-Primer: 5'-CTC AAG CAA CCT GTC AAA GAT G-3'

2.13.8 DNA Sequenzierung:

Die Sequenz spezifischer DNA Fragmente wurde mittels Analyse im ABI-PrismTM310-Genetic-Analyser durchgeführt.

Diese Methode beruht darauf, dass mittels PCR DNA generiert wird, die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide enthält. Die Auftrennung der DNA in den ABI-PRISMTM- System erfolgt durch Elektrophorese in einer Kapillare. Ein 10mW Argonlaser, dessen Hauptemission bei Wellenlängen von 488

nm und 514,5 nm liegt, regt die jeweiligen markierten Basen zur Aussendung von Fluoreszenzstrahlung an.

Ansatz zur Markierung der DNA:

- 4 µl Prämix
- 1 µg DNA
- 2 pmol Primer

Der Reaktionsansatz wird in einem Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

- Denaturierung 96°C
- Elongation 46°C
- Abschlußextension 60°C

Es werden 25 Zyklen durchlaufen.

Probenaufbereitung

Die DNA wird durch Zugabe von 2 µl Natriumacetat pH 4,6 und 55 µl 100% Ethanol gefällt. Nach 15minütiger Zentrifugation wird das Sediment mit 70% Ethanol gewaschen und für 3 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Das Sediment wird in 12 µl TSR-Sequenz-Puffer aufgenommen und vor der anschließenden automatischen Sequenzierung für 2 min denaturiert.

2.14 Protein-Präparation und -Analyse:

2.14.1 Isolierung nukleärer Proteine aus Lebergewebe ⁶⁵:

2.14.1.1 Isolierung der Zellkerne:

- Lebergewebe wird in Homogenisierungspuffer (2,2 M Succrose) mit einem Potter homogenisiert.

- Das Lebergewebe wird im 7-fachem Volumen des 2,2M Succrosepuffers homogenisiert (1 g Leber = 7 ml Succrosepuffer).
- Das Homogenat wird auf ein 2,0 M Suchrosekissen (4,5 ml) geschichtet und zur Sedimentation der Zellkerne in einem 28.1-Swinging-Bucket-Rotor der Fa. Beckman bei 25000rpm 1h bei 4°C zentrifugiert.

Succrosepuffer:

2,2/2,0 M Succrose

10 mM HEPES, (pH 7,6)

15 mM KCl

0,5 mM Spermine

0,5 mM Spermidine

1 mM EDTA

10% Glycerol

2.14.1.2 Lyse der Zellkerne:

- Das Kernpellet wird in 3 ml Kernlysepuffer resuspendiert.
- Die Kerne werden bei 4°C mit einem Potter (Pestle A, Fa. B. Braun) homogenisiert.
- Eine Probe der lysierten Zellkerne wird mit einer 0,5 %-tigen SDS-Lsg. 1:20 verdünnt. Im Spektralphotometer wird der DNA-Gehalt bei einer OD von 260 nm bestimmt.
- Die Kernsuspension wird auf eine Konzentration von 0,5 mg DNA/ml verdünnt.
- Zur Präzipitation der DNA wird 4 M Ammoniumsulfatlösung (pH 7.9) bis zu einer Endkonzentration von 0,4 M zugegeben und 30 min. bei 4°C inkubiert.
- Die DNA Fällung erfolgt durch 60 min. Zentrifugation bei 35000 rpm. und 4°C.
- Zur Präzipitation der Proteine wird der Überstand mit festem Ammoniumsulfat (0,3 g/ml Suspension) versetzt und 30 bis 60 min. bei 4°C geschüttelt.
- Die Kernproteine werden für 25 Minuten bei 35000 rpm. und 4°C in einem TI-70 Rotor (Fa. Beckman) pelletiert.
- Das Proteinpellet wird in 300 µl Dialysepuffer resuspendiert.

Kernlysepuffer:

- 10 mM HEPES (pH 7,6)
- 11 mM KCl
- 0,1 mM EDTA
- 0,3 mM MgCl₂
- 10 % Glycerol

2.14.1.3 Dialyse nukleärer Extrakte:

- Die Proteinlösung wird in Dialyseschläuche gefüllt und 2 mal 2 h gegen Dialysepuffer zur Reinigung von niedermolekularen Verunreinigungen dialysiert.
- Die Proteinkonzentration wird durch einen Bradford-Assay ermittelt.
- Die Proteine werden aliquotiert und bei -80°C gelagert

Dialysepuffer:

- 25 mM HEPES (pH 7,6)
- 40 mM KCl
- 0,1 mM EDTA

2.14.2 Bestimmung der Proteinkonzentration:

2.14.2.1 Bradford-Assay:

Der Proteinassay basiert auf der Veränderung der Farbabsorption des Farbstoffes Comassie Brilliant Blue G-250, die nach Bindung an Proteine erfolgt⁶⁶. Die Proteinkonzentration der Kernextrakte wird durch dieses Verfahren ermittelt.

- 2 µl der Extrakte werden unverdünnt bzw. 1:5 verdünnt mit 798 µl Wasser vermischt und mit 200 µl Biorad-Dye-Reagent-Concentrate (Fa. Biorad) versetzt.
- Die Proben werden auf dem Labormixer durchmischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

- Die Blaufärbung der Probe wird bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen, die Proteinkonzentration über eine BSA-Eichreihe (1-20 µg) berechnet.

2.14.2.2 Spektralphotometrische Bestimmung der Proteinkonzentration:

Alternativ kann die Proteinkonzentration der nukleären Extrakte spektralphotometrisch bestimmt werden.

- 10 µl der Extrakte werden mit 490 µl dH₂O gemischt (1:50).
- Die Absorption wird bei 230nm und 260 nm gegen einen Nullwert (10 µl Dialysepuffer und 490 µl dH₂O) gemessen.
- Die Proteinkonzentration wird nach folgender Formel berechnet:

$$(187 \times \text{OD}_{230} \times 50) - (81,7 \times \text{OD}_{260} \times 50) = X \text{ µg/ml Protein}$$

- Der Quotient aus OD₂₃₀ und OD₂₆₀ stellte ein Maß für die Verunreinigung der nukleären Extrakte mit DNA dar.

2.14.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page):

Die SDS-Polyacrylamidelektrophorese wird zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht eingesetzt. Die Auftrennung erfolgt in einem elektrischem Feld. Anschließend kann man die Proteine im Gel anfärben oder auf eine Membran transferieren.

Die Proteine werden in SDS-Probenpuffer denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgt durch Elektrophorese im denaturierenden SDS-Gel. Die separierten Proteine werden durch Comassie-Färbung dargestellt. Die Größe der Proteine wird im Vergleich mit einem definierten Molekulargewichtsstandard bestimmt⁶⁷.

- 5 µg Protein werden mit H₂O auf ein einheitliches Volumen aufgefüllt.
- Die Proben werden mit 3 x SDS-Auftragspuffer versetzt und bei 95°C 5 min erhitzt.

- Die Ansätze, sowie 10 µl eines Molekulargewichtstandards (Fa. Biorad) werden, auf ein 10 %-tiges SDS-Gel aufgetragen.
- Die Auftrennung erfolgt bei 30 mA im Sammel- bzw. 35 mA im Trenngel, bis die blaue Bromphenolblau-Lauffront die untere Gelkante erreicht hat.

5 %-tiges Sammelgel (ad 5 ml):

0,85 ml 30 % Acrylamid
0,8 % Bisacrylamid
0,625 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8
7,5 ml H₂O
50 µl 10 %-tiges APS-Lsg.
5 µl TEMED

10 %-tiges Trenngel (ad 30 ml):

10 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid
7,5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
12,2 ml H₂O
300 µl 10 %-tigue APS-Lsg
30 µl TEMED

3 x Probenauftragspuffer:

150 mM Tris/HCl, pH 6,8
6 % SDS
15 mM DTT
30 % Glycerol
0,25 % Bromphenolblau

10 x SDS-Laufpuffer (ad 1000ml)

30,3 g Tris Base (250 mM)
144 g Glycine (1,92 M)
10 g SDS (1%)

2.14.4 SDS-Gelfärbung mit Comassie-Brilliant Blue:

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine werden mit dem Farbstoff Comassie-Brilliant-Blue angefärbt. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei 0,1 – 2 µg pro Proteinbande. Im Gel aufgetrennte Proteinmengen lassen sich optisch abschätzen, so dass Comassie-gefärbte Gele als Ladungskontrolle für weitere, in dieser Arbeit verwendete Verfahren (Western-Blot, Mercury Transfactor Assay, Gel-Retentionsanalyse) dienen. Es wird eine kolloidale Comassie-Suspension der Fa. Roth gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

2.14.5 Western Blot:

Der Western Blot dient dem Nachweis spezifischer Proteine. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden unter elektrischer Spannung auf eine Membran transferiert⁶⁷. Dort werden diese von spezifischen primärer Antikörper gebunden. In einem nachfolgenden Inkubationsschritt lagert sich der sekundäre, Peroxidasegekoppelte Antikörper an den Komplex.

In einer Licht emittierenden Peroxidase-Reaktion werden die spezifischen Proteinbanden auf einem Röntgenfilm nachgewiesen.

Die durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden in einer Standard-Naßblotkammer auf eine Nylonmembran transferiert⁶⁸.

- Der Proteintransfer wird im Transferpuffer bei 4°C bei konstant 20 Volt über Nacht, bzw. bei 450 mA über 2 Stunden durchgeführt.
- Anschließend wird die Membran durch eine 1-stündige Inkubation in Roti-Block (Fa. Roth/1:10 Verdünnung in H₂O) oder in 5 %-tiger Magermilchlösung in TBS-Tween gegen unspezifische Proteinbindung abgesättigt.
- Es folgt eine einstündige Inkubation mit dem spezifischen primären Antikörper, der nach den Angaben der jeweiligen Hersteller in Waschpuffer verdünnt wird.
- Nach dreimaligem Waschen mit TBST wird die Membran über einen Zeitraum von einer Stunde mit einer 1:10000 bzw. 1:20000 Verdünnung des sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörpers inkubiert.

- Nach mehrmaligem Waschen mit TBST wird die Membran mit dem Substratansatz gemäß den Angaben des Herstellers (EXL-Western-Blot-analysis System-Enhanced Chemilumineszens, Fa. Amersham) entwickelt.
- Die durch die Peroxidase-Reaktion emittierten Lichtsignale werden auf einem Röntgenfilm dargestellt.

Transferpuffer, pH 8,3:

39 mM Glycine

48 mM Tris-HCl

0,037 % SDS

20 % Methanol

Waschpuffer (TBS-Tween) pH 7,6:

20 mM Tris-HCl

137 mM NaCl

0,1 % Tween 20

pH-Wert mit 1 M HCl einstellen

Stripping-Puffer, pH 6,7:

65,5 mM Tris-HCl

2 % SDS

100 mM 2-Mercaptoethanol

2.14.6 Gel-Retentionsanalyse:

Zur Darstellung der Interaktion von Proteinen mit DNA-Fragmenten kann die Gel Retentionsanalyse eingesetzt werden. Ein für das zu analysierende Protein bindungsspezifisches, radioaktiv markiertes DNA-Oligonukleotid wird unter geeigneten Bedingungen mit dem Proteingemisch inkubiert.

Spezifische Protein-DNA-Komplexe bilden sich. Anschließend folgt eine elektrophoretische Auftrennung in einem nativen Acrylamidgel. DNA-Proteinkomplexe trennen

sich aufgrund ihres veränderten Laufverhaltens von nicht gebundenen Oligonukleotiden⁶⁹.

Im „Super-Shift-Assay“ wird das an der Komplexbildung beteiligte Protein durch die Zugabe spezifischer Antikörper identifiziert. Der Antikörper bindet an den Komplex aus Protein und DNA und führt somit zu einer Veränderung des Laufverhaltens im Polyacrylamidgel.

2.14.6.1 Herstellung eines doppelsträngigen DNA-Oligonukleotids:

- Gleiche Mengen komplementärer DNA-Einzelstränge werden mit 10 x Annealing-Puffer versetzt und mit H₂O auf eine 1x Konzentration des Annealing Puffers verdünnt.
- 5-minütiges Erhitzen bei 95°C denaturiert die Oligonukleotide.
- Während des langsamen Abkühlens auf Raumtemperatur hybridisieren die Oligonukleotide zu einem Doppelstrang.
- Es folgt die Lagerung bei -20°C.

10 x Annealingpuffer:

200 mM Tris-HCl, pH 7,6

100 mM MgCl₂

500 mM NaCl

2.14.6.2 Radioaktive Markierung des doppelsträngigen Oligonukleotids:

- Durch die Polynukleotid-Kinase des Bakteriophagen T4 (Fa. Biolabs) wird das doppelsträngige DNA-Fragment an den endständigen 5'-Hydroxygruppen mit P₃₂-γ-ATP (Fa. Amersham) markiert.
- Nach einer 60-minütigen Inkubation des Reaktionsansatzes bei 37°C, werden die markierten Oligonukleotide über eine Nick-Spin-Column (Fa. Pharmacia) von nicht gebundenem P₃₂-γ-ATP getrennt.

- Die radioaktive Aktivität des markierten Oligonukleotids wird am β -Counter ermittelt.

Reaktionsansatz:

- 3,3 μ l Oligonukleotid (125 ng)
- 2,0 μ l 10 x T4-Kinase-Puffer
- 9,7 μ l H₂O
- 1,0 μ l T4-Kinase

2.14.6.3 Trennung der Protein-DNA-Komplexe im Acrylamid-Gel:

- Im Reaktionsansatz werden zur Proteinlösung (1-5 μ g) 4 μ l 5 x Bindungspuffer, 2 μ l 10 x Proteinase-Inhibitorcocktail, 1 μ l Poly dl:dC (1 μ g/ μ l), 1 μ l BSA (10 μ g/ μ l in H₂O) und ³²P-markiertes Oligonukleotid (30000 cpm/Reaktionsansatz) gegeben und mit H₂O auf ein Volumen von 20 μ l aufgefüllt. Als Kontrolle dient der gleiche Bindungsansatz ohne Proteinzugabe.
- Die Reaktionsansätze werden 30 min bei 4°C inkubiert.
- Es wird 2 μ l Auftragspuffer (20 %-tige Ficoll suspension) hinzugefügt.
- Die Proben werden auf ein nicht denaturierendes Acrylamidgel (5 %) aufgetragen.
- Über einen Zeitraum von ca. 2 Stunden wird eine Spannung von 300 Volt angelegt.
- Das Gel wird 15 min. in Fixierlösung inkubiert.
- Das Gel wird 1h bei 70°C auf einem Vakuum Geltrockner dehydriert.
- Es folgt Exposition bei -80°C.

Supershift-Experimente werden nach dem gleichen Protokoll durchgeführt. Dabei erfolgt nach der Inkubation des Reaktionsansatzes die Zugabe des spezifischen Antikörpers (0,5 –2 μ g/Probe) und eine 45-minütige Inkubation auf Eis.

5 %-tiges Polyacrylamidgel, ad 50 ml:

- 2,5 ml 5 x TBE
- 8,3 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid
- 39,2 ml dH₂O

350 μ l 10 %-tige APS-Lsg.

50 μ l TEMED

0,25 x Laufpuffer, ad 1500 ml:

75 ml 5x TBE

1425 ml dH₂O

10 x Proteinase-Inhibitorcocktail, ad 1 ml:

20 μ l 1 M DTT

20 μ l 0,1 M Pefabloc

200 μ l Aprotinin-Lsg.

760 μ l dH₂O

5 x Bindungs-Puffer, ad 1 ml:

125 μ l 1 M HEPES, pH 7,6

50 μ l 0,5 M MgCl₂

170 μ l 1 M KCl

655 μ l dH₂O

5 x TBE:

0,045 M Tris-Base

0,44 M Borsäure

1 mM EDTA, pH 8,0

Gelfixierer:

10 % Essigsäure

20 % Methanol

2.14.7 Quantifizierung der Transkriptionsfaktor Bindungsaktivität (Mercury™ transfactor Kit):

Alternativ zur Supershift Gel Retentionsanalyse kann die DNA Bindung eines spezifischen Transkriptionsfaktors mit Hilfe dieser auf einer ELISA Technik basierenden Methode ermittelt werden.

Konsensus-DNA-Oligonukleotide für den zu analysierenden Transkriptionsfaktor sind an eine 96-well Platte gebunden. Nach Inkubation mit den zu untersuchenden Proteinextrakten, bindet der potentiell vorhandene Transkriptionsfaktor. Mittels Inkubation mit dem Transkriptionsfaktor-spezifischen Erstantikörper und darauf folgender Kopplung mit dem Detektionsantikörper kann die Menge des gebundenen Transkriptionsfaktors ermittelt werden.

Entscheidend ist der Abgleich der eingesetzten Proteinmengen. Zur Messung von cFOS wurden die Mengen eingesetzten Proteins durch ein Commassie-gefärbtes SDS Proteingel und eine Bradford Proteinkonzentrationsbestimmung verifiziert.

Der detaillierte Ablauf ist dem „User Manual“ der Firma Clontech (PT3594-1) zu entnehmen. Die photometrische Messung erfolgte im Photometer Lamda-Scan 200e der Firma MWG.

2.14.8 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay):

Die Konzentrationen von IL-6, TNF und SAA im Blutserum von Mäusen wird mittels ELISA (Voller et al., 1980) bestimmt.

Das Prinzip der verschiedenen ELISA Typen ist redundant. Aus diesem Grund wird hier nur das Grundprinzip der Methode dargestellt und im Weiteren auf die Herstellerangaben verwiesen.

Alle Tests beruhen auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA. Die Tests werden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Platten werden mit dem spezifischen Primärantikörper beschichtet, bei Raumtemperatur geblockt und mit seriellen Probenverdünnungen inkubiert.

Die verwendeten Verdünnungen und die Inkubationszeiten werden je nach ELISA optimiert. Nach dem Waschen mit der entsprechenden Waschlösung erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Dieser ist gegen den Erstantikörper gerichtet.

Das Tertiärreagenz dient der Visualisierung gebundenen Zweitantikörpers. Die Bestimmung der Extinktion wird mit einem ELISA-Reader (Fa. Anthos Labtech Instruments) durchgeführt.

Die genaue Durchführung der Elisa Analysen sind den angegebenen Gebrauchsanweisungen zu entnehmen.

2.14.8.1 IL6 ELISA:

Firma Pharmingen Kat. Nr. 2653KI

2.14.8.2 TNF ELISA:

Firma Pharmingen Kat. Nr. 2673KI

2.14.8.3 SAA ELISA:

Firma Biosource international Kat. nr.:KM-A0012

2.14.9 Messung der Aktivität der Aminotransferasen GOT und GPT:

Zur Ermittlung der Aktivität der Aminotransferasen im Serum behandelter Tiere wurde ein Produkt der Firma Roche verwendet. Die Messung beruht auf der „*Optimierten Standard-Methode der Gesellschaft für Klinischen Chemie*“⁷⁰.

Gewinnung von Serum aus Blut:

- Die Blutproben werden bei 4000rpm für 20 min. und 4°C zentrifugiert.
- Das Serum wird abgenommen und bei -20°C eingefroren.
- Zur Messung wird das Serum zwischen 10- und 50-fach mit 0,9% NaCL verdünnt.
- Die Messung erfolgt im Epos-Analyser 5060 (Fa. Eppendorf).

2.15 RNA Präparation und –Analyse:

2.15.1 RNA Isolierung aus Gewebe:

- Für die Isolierung von RNA wird ein Gewebestück (ca. 50-100mg) in der RNA-Clean™ Lösung (Fa. HYBAID) (2 ml pro 100 mg Gewebe) durch einen Glas-Teflon Homogenisator homogenisiert.
- Zu 2 ml des Homogenats werden anschließend 0.2 ml Chloroform gegeben.
- Die Proben werden für 15 Sekunden geschüttelt und auf Eis für 5 Minuten inkubiert.
- Nachdem die Proben für 15 Minuten bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert wurden, wird die obere, RNA enthaltende Phase in ein neues Gefäß überführt.
- Zu dieser wässrigen Phase wird ein gleiches Volumen Isopropanol gegeben, gemischt und bei -20°C für 15 Minuten inkubiert.
- Es folgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 12000 x g und 4°C.
- Anschließend wird der Überstand vorsichtig dekantiert.
- Das RNA-Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen.
- Anschließend wird für 8 Minuten bei 7500 x g und 4°C zentrifugiert. Der Waschschritt wird mindestens einmal wiederholt.
- Das RNA-Pellet wird für ca. 10 Minuten an der Luft getrocknet.
- Die RNA wird anschließend in RNase freiem Wasser aufgenommen.

2.15.2 Bestimmung der RNA-Konzentration:

Die RNA-Konzentration wird im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt.

Definition der Berechnung der RNA-Konzentration:

$$\text{Eine OD A260 von 1 entspricht 40 } \mu\text{g/ml (spez. RNA-Faktor)}$$
$$\text{A260} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{spez. RNA-Faktor} = Y \mu\text{g/ml RNA}$$

Bestimmung der RNA-Reinheit:

$$A_{260}/A_{280} = z (1.8 - 2.0)$$

Ein ausreichender Reinheitsgrad ist bei einem Wert zwischen 1.8 und 2.0 gewährleistet.

2.15.3 Northern-Blot:

Durch die Northern-Blot Analyse kann sowohl qualitativ, als auch quantitativ die Expression einer spezifischen mRNA Population untersucht werden.

Die zu analysierende RNA wird in einem denaturierenden Agarose-Gel entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird sie auf eine geeignete Trägermembran transferiert. Durch Hybridisierung mit einem radioaktiv markierten, der RNA Sequenz komplementären DNA und der anschließende Autoradiographie, wird eine die Visualisierung und Quantifizierung des zu analysierenden Gens ermöglicht.

2.15.3.1 RNA-Gelelektrophorese:

- Die RNA wird in einem 1 %-tigem Agarose/ 1 x MOPS/ 0.22 M Formaldehyd –Gel in 1 x MOPS/ 0.22M Formaldehyd-Laufpuffer bei 100 – 150 Volt elektrophoretisch aufgetrennt.
- Der RNA-Ansatz wird vor dem Beladen des Gels mit 1/5 Volumen RNA-Ladepuffer versetzt und 3 bis 5 Minuten bei 65°C inkubiert.

10 x Mops-Puffer, pH 7, ad 1000ml:

41.8g	Mops(0.2M)
06.8g	Natriumazetat (50mM)
2 ml	0.5 M EDTA, pH 8 (0.01M)

5 x Ladepuffer, ad 10ml:

16	µl	Bromophenol-Blue-Lsg.
80	µl	0.5 M EDTA, pH 8
100	µl	EtBr (Stock 10 mg/ml)
720	µl	37% Formaldehyd
2000	µl	100% Glycerol
3084	µl	Formamid
4000	µl	10 x MOPS

2.15.3.2 SSC-Semidry-Blot:

Die im Agarose Gel aufgetrennt RNA wird auf eine Membran transferiert.

- Eine Hybond N+ Nylonmembran wird mit Aqua dest. benetzt und 10 min in 2 x SSC geschwenkt.
- Der Aufbau der Semi-Dry-Blotapparatur erfolgte dann wie folgend beschrieben (Reihenfolge von oben nach unten):
 - Glasplatte, beschwert durch ein Gewicht
 - Ein Stapel aus saugfähigem Zellstoff
 - 3x 3MM Whatman Filterpapier, trocken
 - 3x 3MM Whatman Filterpapier, 10 x SSC getränkt
 - Hybond N+ Nylonmembran
 - RNA Agarose-Gel
 - 6x 3MM Whatman Filterpapier, 10 x SSC Puffer getränkt
- Der Transfer benötigt ca. 18 h.
- Zur Immobilisierung der RNA wird die Trägermembran mit 2 x SSC gewaschen und anschließend bei RT 20 min. getrocknet.

- Eine irreversible, kovalente Bindung der RNA an die Membranoberfläche wird durch das UV-Crosslinking mittels eines Crosslinkers (Fa. Stratagene) erreicht, wobei hochenergetische UV-Strahlung die Quervernetzung induziert.

2.15.3.3 Die Radioaktive Markierung von DNA Fragmenten:

Nach einer modifizierten Methode von Feinberg und Vogelstein können DNA Fragmente radioaktiv markiert werden. Dazu werden nach Denaturierung des zu markierenden DNA-Stranges Hexanucleotide statistischer Zusammensetzung als Primer hybridisiert. Die Markierung erfolgt während der Doppelstrangsynthese mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I in Gegenwart eines Desoxynucleotidmixes und eines radioaktiv markierten Nucleotids. Diese Methode wird mit Hilfe des Readyprime™II Kit (Fa. Amersham), dem Herstellerprotokoll folgend, durchgeführt.

- 25 ng DNA werden in 45 µl TE pH 8,0 zur Denaturierung für 5 min auf 95°C erhitzt.
- Es folgt die Abkühlung auf 4°C.
- Die denaturierte DNA wird zu einem Reaktions-Mix hinzugefügt, mit 5 µl [³²P]α-dCTP versetzt, gemischt und für 60 min. bei 37°C inkubiert.
- Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 gestoppt.
- Das Probenvolumen wird über eine S-200 nick spin column (Amersham) von nicht inkorporierten Nucleotiden getrennt.
- Die Inkorporation radioaktiv markierter DNA wird durch die Messung der Probe im β-Szintillationszähler überprüft.

2.15.3.4 Die RNA-DNA Hybridisierung:

Die radioaktiv markierte, spezifische DNA-Sonde hybridisiert mit der immobilisierten, komplementären RNA des zu analysierenden Gens. Die Hybridisierung der Membran mit dem radioaktiv markierten DNA-Fragment erfolgte bei einer der Größe des markierten Fragments angepassten Temperatur (55-65 °C) ⁷¹.

- Die Membran wird bei 55-65°C mit CHURCH Lösung im Hybridisierungssofen prä-hybridisiert.
- Radioaktiv markiertes, denaturiertes DNA Fragment wird mit der Hybridisierungslösung (CHURCH-Lösung) auf eine Aktivität von 0,5-2 Mio. cpm verdünnt und auf die Membran gegeben.
- Die Hybridisierung erfolgt für ca. 18h bei 55-65°C.
- Um unspezifischen Hintergrund zu reduzieren, wird die Membran bei 55-65°C für je 15min gewaschen.
- Die Waschschrirte werden mit Waschlösung x-fach SSC/0,1%SDS unter ansteigender Stringenz durchgeführt. (5x SSC - 0,1x SSC). Nach jedem Waschschrirte wird die Membran mit dem Handcounter auf verbliebenen Hintergrund kontrolliert.
- Die Membran wird bei -80°C exponiert.

Church-Lösung, ad 1000 ml:

250 ml 1 M NaPO₄, pH 7.2
350 ml 20%-igen SDS-Lsg.
20 ml 0.5 M EDTA, pH 8

20 x SSC ad 1000ml:

175.3 g (3 M) NaCl
88.2 g (0.3 M) Na₃Citrat * 2 H₂O
den pH auf 7.0 mit 1 M HCl einstellen

3 ERGEBNISSE

3.1 ME3738 wirkt protektiv im ConA Modell der experimentellen Hepatitis:

3.1.1 ME3738 Vorbehandlung verhindert die ConA induzierte Leberzelldegeneration:

Das primäre Ziel der vorliegenden Dissertation war die Charakterisierung der ME3738 induzierten Effekte im Modell der Concanavalin-A vermittelten Hepatitis. Behandlung mit Sojasapogenol-A, ein aus der Sojabohne isolierbares ME3738 verwandtes Sapogenin, führt zu einer Verringerung der Aktivität der Serumtransaminasen im ConA Modell. Die beiden Substanzen unterscheiden sich nur wenig voneinander. Dennoch wurden im Modell der CCL4 induzierten Hepatitis Unterschiede in der Wirkungsweise festgestellt (Meiji Investigator Brochure, 2001) ¹²⁷. Im Gegensatz zu Sojasapogenol-A reduziert ME3738 in diesem Intoxikationsmodell die Konzentration der Serumtransaminasen GOT und GPT. Die Bildung von nekrotischen und pathologisch fibrosinierten Bereichen in den Lebern behandelte Ratten ist signifikant reduziert (Meiji Investigator Brochure, 2001) ¹²⁷.

Das ConA Modell simuliert eine akute T-Zell vermittelte Hepatitis. Das Ausmaß der ConA induzierten Leberschädigung ist abhängig von der injizierten ConA Dosis und ConA-Sensitivität des eingesetzten Mausstamms. Um protektive Effekte einer therapeutischen Intervention sicher verifizieren zu können wurde in den folgenden Versuchen eine an der Grenze zur Letalität liegende ConA Dosis gewählt.

Der verwendete BALB/C Mausstamm erwies sich in Vorexperimenten in Bezug auf eine verlässliche Reproduzierbarkeit der Leberschäden als besonders geeignet ⁷².

Abb. 3.1 zeigt die Aktivität der Serumtransaminasen in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis ConA. Es wurden pro Tier 20, 25, 30 und 40 mg/kg ConA intravenös injiziert. 40 mg/kg erwies sich als letal. Alle 40mg/kg ConA behandelten Mäuse starben zwischen 4 h und 12 h nach ConA Injektion.

Für die weiteren Experimente wurden 30 mg/kg ConA injiziert, da die Serumtransaminasen hohe Werte erreichen und so Protektionseffekte von zufälligen Schwankungen sicher zu unterscheiden sind.

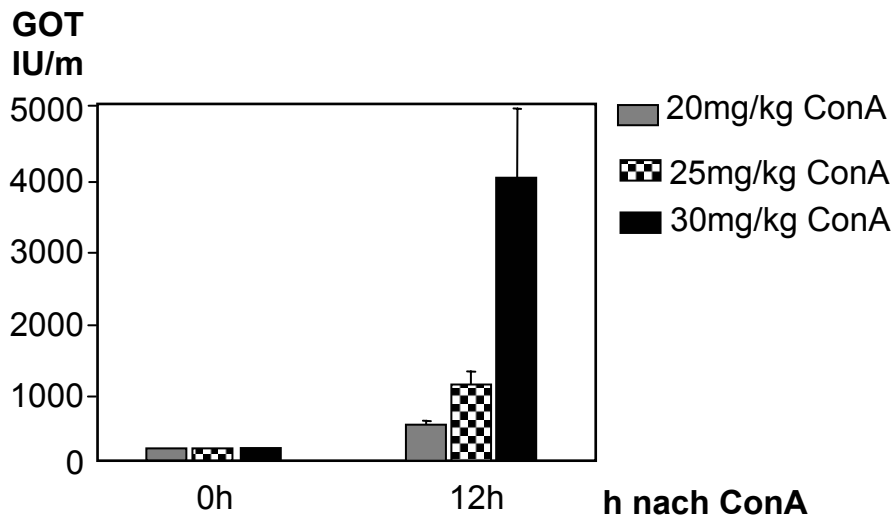


Abb.3.1: Die GOT Aktivität in Abhängigkeit der ConA Dosis:

6-8 Wochen alten BALB/C Mäusen wurden die angegebenen Mengen Concanavalin-A intravenös injiziert. Nach 12 h wurde den Tieren retroorbital Blut entnommen, und das Serum auf GOT Aktivität untersucht. Jeder Zeitpunkt repräsentiert 3 Tiere. 40mg/kg ConA erwiesen sich bei allen Tieren als letal.

Die Applikation von ME3738 erfolgt in Form einer Präventionstherapie. Für Sojasapogenol A konnte gezeigt werden, dass die zweifache subkutane Injektion 14 h und 2 h vor der ConA Injektion zu einer signifikanten Reduktion der Serumtransaminasen führt ⁷³.

Gruppe	-14 Stunden	-2 Stunden	0 Stunden (ConA)
1) ConA	0,5%CMC	100µl 0,5%CMC	30mg/kg ConA
2) ME3738+ConA	40mg/kg ME3738	40mg/kg ME3738	30mg/kg ConA
3) CMC	0,5%CMC	100µl 0,5%CMC	0,9% NaCl
4) ME3738	40mg/kg ME3738	40mg/kg ME3738	0,9% NaCl

Abb. 3.2: Das Behandlungsschema der 4 Gruppen:

Entsprechend wurden die Tiere in den folgenden Experimenten vor ConA Gabe mit 40mg/kg ME3738 behandelt. Es wurden in jedem Experiment 4 Gruppen von Tieren eingesetzt (Abb. 3.2).

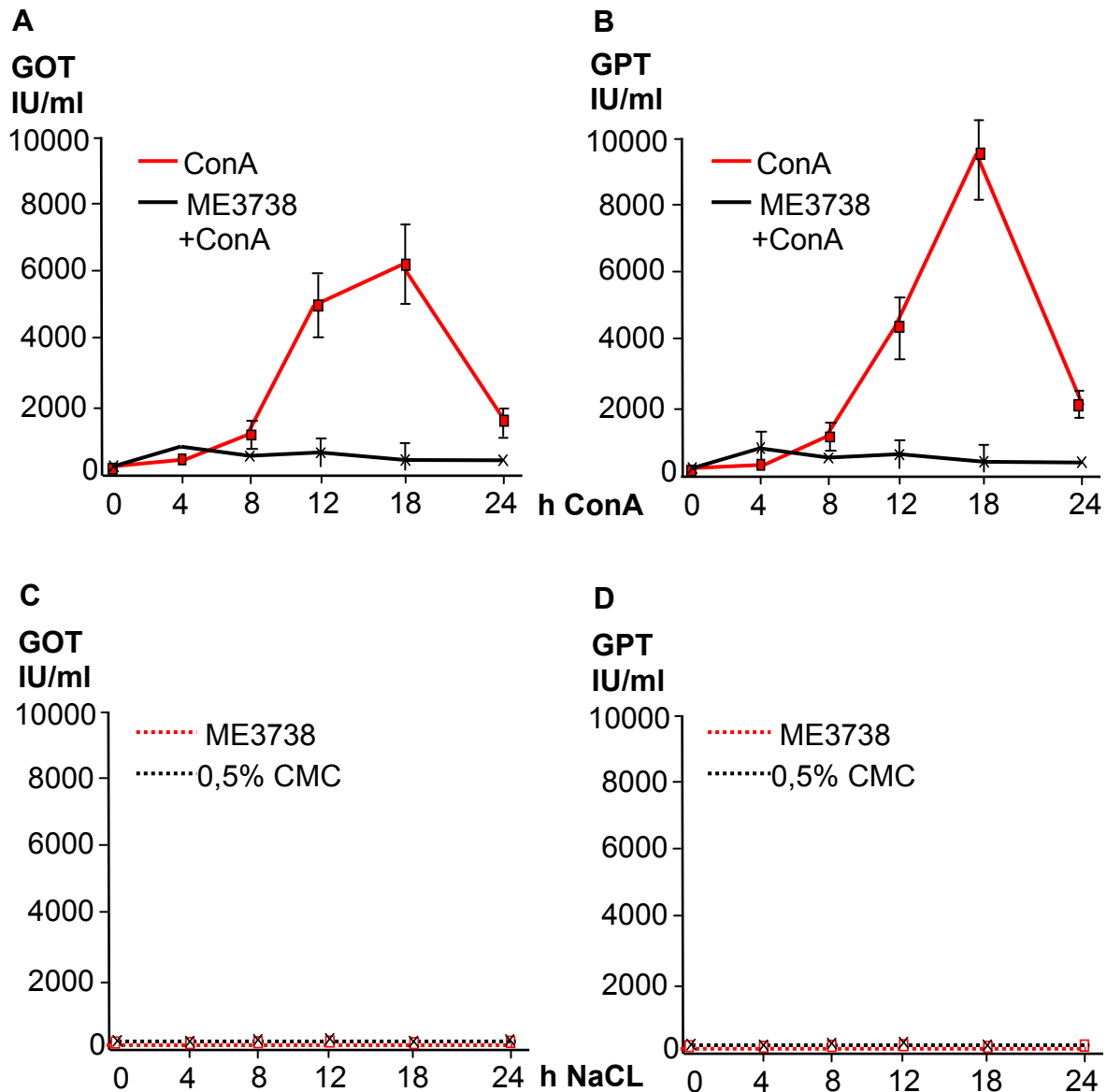


Abb. 3.3: Die Aktivität der Transaminasen GOT und GPT im Serum von BALB/C Mäusen: ME3738 Therapie bewirkt eine Inhibition des Anstiegs der Transaminasenaktivität im Verlauf der ConA Hepatitis.

Pro Zeitpunkt und Gruppe wurden 3-6 BALB/C Mäuse in die Erhebung der Messergebnisse einbezogen. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren retroorbital Blut entnommen, und das Serum auf GOT/GPT Aktivität untersucht.

A) Die GOT Aktivität ConA (roter Graph) oder ME3738 und ConA (schwarzer Graph) behandelte Mäuse. B) Die GPT Aktivität ConA (roter Graph) oder ME3738 und ConA (schwarzer Graph) behandelte Mäuse. C) Die GOT Aktivität ME3738 (roter Graph) oder CMC (schwarzer Graph) behandelte Mäuse. D) Die GPT Aktivität ME3738 (roter Graph) CMC (schwarzer Graph) behandelte Mäuse.

Gruppe 3 und 4 stellen Kontrollen dar (Abb. 3.3 C/D), um Effekte des Lösungsmittels CMC (Gruppe 3) oder durch ME3738 (Gruppe 4) auf die Messparameter ausschließen zu können.

Die Wirkung von ME3738 auf die Transaminasenaktivität im Serum ist in Abb. 3.3 dargestellt.

In der nicht ME3738 therapierten Gruppe 1 steigt die Aktivität der Serumtransaminasen GOT und GPT im Verlauf der Hepatitis massiv an, erreicht das Maximum bei 18 h - 24 h nach ConA Injektion und fällt dann kontinuierlich auf das Ausgangsniveau (Abb. 3.3 A/B roter Graph). Im Fokus dieses Experiments stand die Frühphase der ConA induzierten Hepatitis, also vor allem die Zeit bis zum Erreichen des Maximums der Transaminasenwerte. Aus diesem Grund wurden keine späteren Zeitpunkte in die Untersuchung einbezogen.

Me3738 Behandlung führt dagegen zu einer deutlichen Verringerung der GOT und GPT Werte. Die Aktivität der Transaminasen bleibt innerhalb des ermittelten Zeitrahmens nahezu auf Kontrollniveau. Man kann daher von einer völligen Inhibition der ConA Hepatitis sprechen (Abb. 3.3 A/B schwarzer Graph). Dieser Effekt tritt allerdings nur bei ca. 80% der behandelten Tiere auf. Tiere die nicht auf ME3738 ansprachen wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Aus diesem Grund bestand die Gruppe ME3738+ConA behandelte Tiere aus mindestens 6-8 Individuen, um eine zufällige Anhäufung von „*Non-Respondern*“ erkennen zu können.

Concanavalin-A hat eine hohe Bindungsaffinität zu den hepatischen Sinusoiden und führt dadurch zur Aktivierung und Infiltration mononukleärer Zellen in die Leber. Zunächst NKT- und später CD4⁺-Zellen sind an den initialen Schädigungsprozessen beteiligt^{14,15,16,17}. Um die Infiltration von mononukleären Zellen und Gewebedegeneration im Rahmen der ME3738 induzierten Leberprotektion untersuchen zu können, wurden Kryoschnitte von eingefrorenen Leberbiopsien angefertigt. Durch spezifische Färbung der Nuklei und eine Gegenfärbung des Zytoplasmas, können nekrotische Bereiche sowie Anhäufungen infiltrierender mononukleärer Zellen lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden.

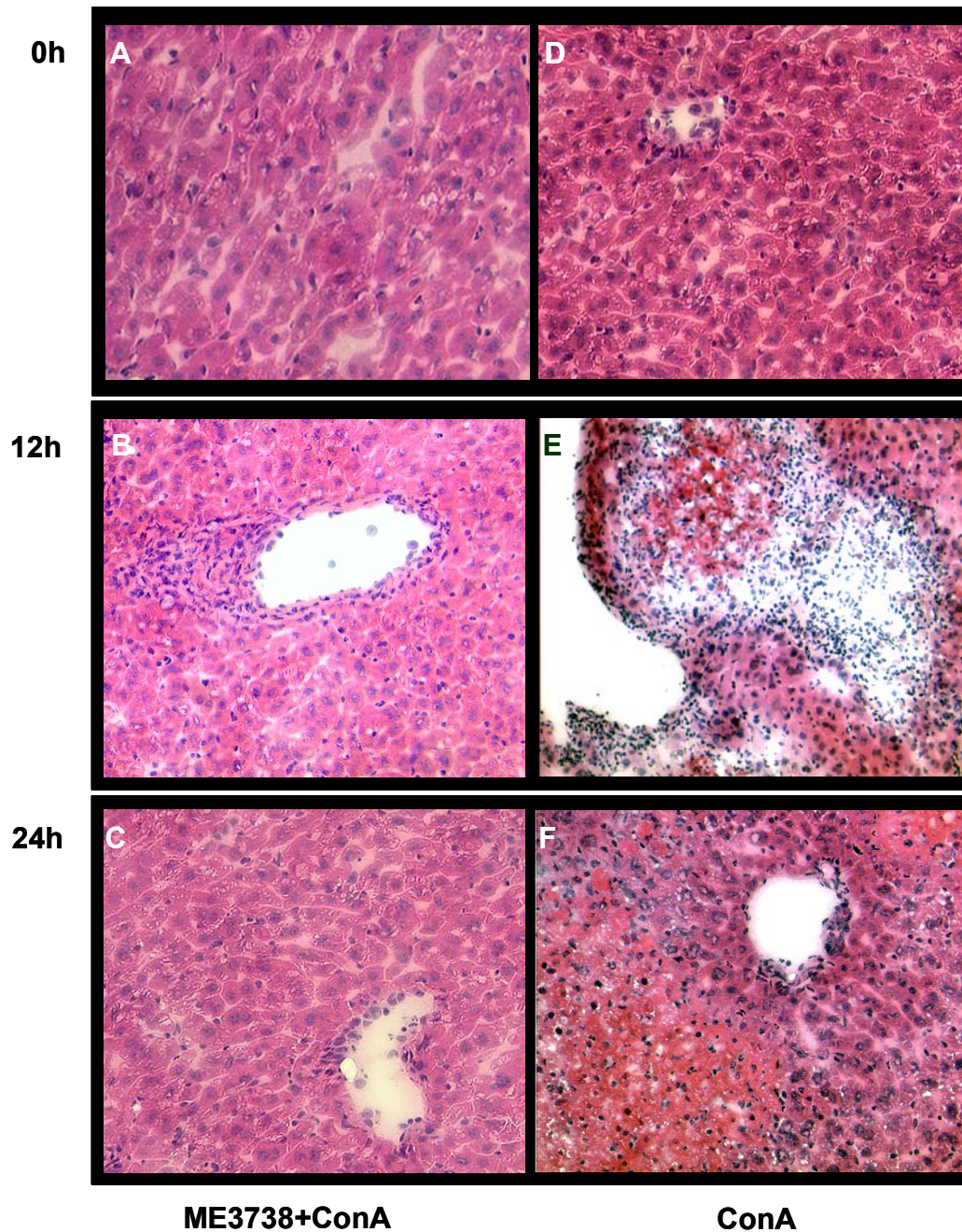


Abb. 3.4: Hämatoxylin / Eosinfärbung von Leberschnitten ConA injizierter BALB/C Mäuse: ME3738 verhindert nicht die Rekrutierung mononukleärer Zellen in der Leber. Die Zerstörung von Lebergewebe wird dagegen inhibiert.

Schnitte von ME3738 vorbehandelten BALB/C Mäusen (A-C). Es handelt sich um Leberbiopsien der Tiere deren Serumtransaminasenwerte in Abb. 3.3 A/B dargestellt sind (ME+ConA-Graph).

D-F zeigt Schnitte von nicht ME3738 therapierten Tieren.

Bei ME3738 therapierten und nicht therapierten Tieren kommt es zu einer Infiltration der Leber mit mononukleären Zellen (Abb. 3.4 B). Die Zerstörung von Hepatozyten ist bei ME3738 behandelten Mäusen nicht detektierbar (Abb. 3.4 A-C).

Sind die Tiere nicht mit ME3738 behandelt worden, bilden sich Felder degenerierter oder abgestorbener Zellen (Abb. 3.4. E/F). Das Ergebnis korreliert mit den im Vergleich zu unbehandelten Tieren reduzierten Transaminasenwerten (Abb. 3.3 A/B) und deutet darauf hin, dass ME3738 auf Hepatozytenebene protektiv wirksam wird. Eine veränderte Rekrutierung von T-Zellen in den Lebersinusoiden findet dagegen nicht statt.

3.1.2 ME3738 verändert das Zytokinmilieu der ConA Hepatitis:

Die ConA induzierte Hepatitis ist assoziiert mit dem Anstieg der Serumkonzentrationen verschiedener Zytokine. Unter anderem IL2, IL4, IL6, IFN γ , und TNF sind zu verschiedenen Zeitpunkten der ConA-Hepatitis nachweisbar^{13,14,18,19}.

Neben IFN γ vermittelt vor allem TNF die Initiierung der hepatozytenschädigenden Ereignisse. Folglich wurden mit der ME3738 Behandlung einhergehende Veränderungen des Zytokinmilieu der ConA Hepatitis untersucht.

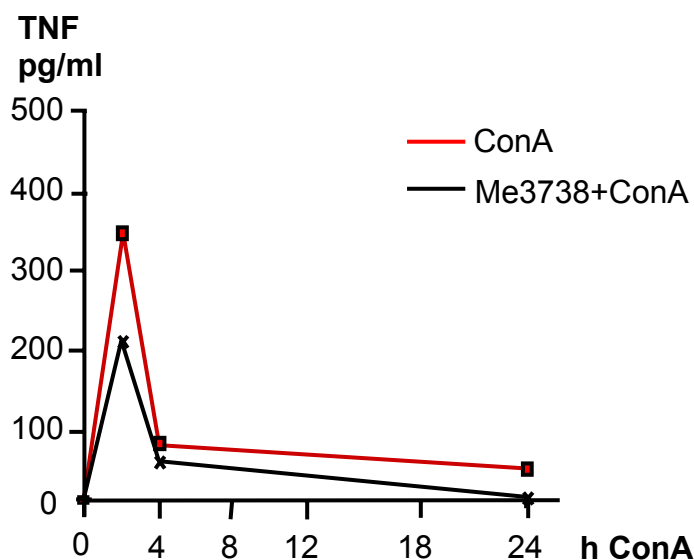


Abb. 3.5: TNF Konzentrationen im Serum mit und ohne ME3738 Therapie: ME3738 reduziert die TNF Konzentrationen um ca. 40 %.

Für die Messung wurden die Seren von 6 Tieren der ME3738+ConA Gruppe und 4 Tieren der ConA Gruppe zu gleichen Anteilen vereinigt. Alle Tiere wurden bis 24h nach ConA Injektion beobachtet und nach 24h wurde die Serumtransaminasenaktivität ermittelt, um die Reproduzierbarkeit des ME3738 vermittelten Schutzes zu gewährleisten.

Die TNF Konzentrationen im Serum ME3738 therapierter BALB/C Mäuse wurden mittels eines TNF-ELISA detektiert. Die Vorbehandlung mit ME3738 führt zum Zeitpunkt der maximalen TNF Konzentration zu einer ca. 40% tigen Reduktion des Zytokins im Serum der Tiere (Abb. 3.5).

Auch die IFN γ Serumwerte werden reduziert. ME3738 Therapie resultiert in einer Reduktion von IFN γ von 1200 (+/- 200) auf 900 (+/- 50). Die Reduktion bezieht sich dabei auf das IFN γ Maximum 8h nach ConA Injektion (Investigator Brochure, Meiji 2001)¹²⁷.

Die Konzentrationen der Zytokine IL4 und IL2, die ebenfalls im Rahmen der ConA Hepatitis ansteigen, sind dagegen unverändert (Meiji Investigator Brochure, 2001)¹²⁷.

Es handelt sich somit nicht um eine allgemeine Inhibition der Zytokinsekretion. Die Effekte betreffen spezifische Zytokine.

Diese These wird durch die Ermittlung der IL6 Serumwerte unterstützt.

Für IL6 sind protektive Effekte in diesem Modell beschrieben¹⁸. So ist ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten IL6 Konzentrationen im Serum auf die Inhibition der TNF Expression in Monozyten nachgewiesen²³.

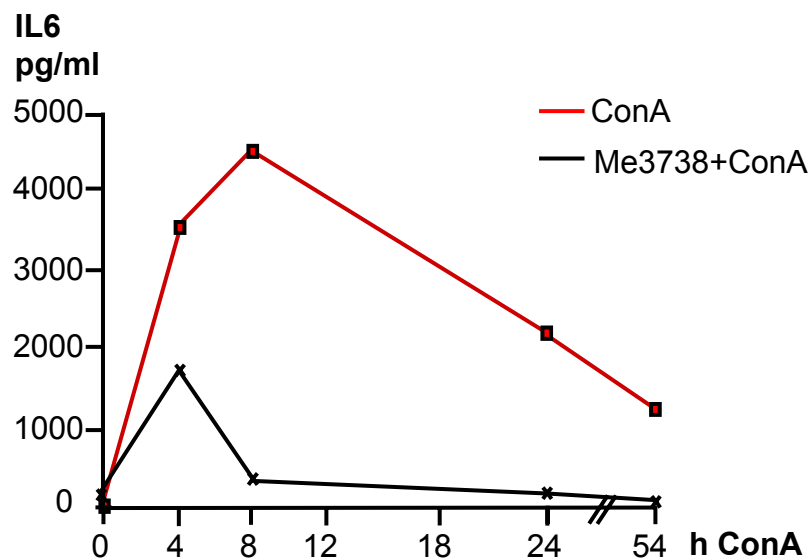


Abb. 3.6: IL6 Konzentrationen im Serum mit und ohne ME3738 Therapie: ME3738 reduziert die IL6 Konzentrationen schon in der Frühphase der ConA Hepatitis. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer anhaltenden Reduktion der IL6 Werte.

Für die Messung wurden die Seren von 6 Tieren der ME3738+ConA Gruppe und 4 Tieren der ConA Gruppe zu gleichen Anteilen vereinigt. Alle Tiere wurden bis 54h nach ConA Injektion beobachtet und nach 24h wurde die Serumtransaminasenaktivität ermittelt, um die Reproduzierbarkeit des ME3738 vermittelten Schutzes zu gewährleisten.

Dieser Mechanismus könnte einen Teilaspekt IL6 vermittelter Protektion im ConA Modell wiedergeben.

Andere Ergebnisse deuten darauf hin, dass IL6 auch in Hepatozyten zellprotektive Signalwege aktivieren kann und mit hepatozellulärer Proliferation korreliert^{24 25}. Aus diesem Grund war die Auswirkung der ME3738 Vorbehandlung auf die IL6 Sekretion von besonderem Interesse.

Die IL6 Serumwerte steigen in den nicht ME3738 behandelten Mäusen bis zum Erreichen des Maximums bei 8h an. Bis 54h nach ConA Injektion sind erhöhte IL6 Serumwerte detektierbar (Abb. 3.6 roter Graph).

Dagegen erreichen die IL6 Werte in der ME3738 therapierten Gruppe schon 4h nach ConA Injektion das Maximum. Es kommt zu einer schnellen Normalisierung und Unterschreitung des Ausgangsniveaus (Abb. 3.6 schwarzer Graph). ME3738 Vorbehandlung allein führt zu einem leichten Anstieg der IL6 Serumkonzentrationen (Abb. 3.6, schwarzer Graph, 0h). Der Wert lag ähnlich den Werten der ME3738 Kontrollgruppe, bei ca. 50-100 pg/ml. Ansonsten war in den Kontrollgruppen weder TNF, noch IL6 detektierbar (siehe Abb. 3.2 Gruppe 3 und 4).

Neben der ME3738 verursachten IL6 Induktion kommt es auch bei ConA aktivierten, intrazellulären Faktoren zu zeitlich veränderten Aktivierungsmustern.

3.1.3 ME3738 Therapie verändert die TNF abhängige hepatozelluläre Signaltransduktion:

Mit der Sekretion von TNF korrelierend, wird im Verlauf der ConA Hepatitis NFκB in der Leber aktiviert^{18,21}. Durch ME3738 Injektion wird der ConA Leberschaden inhibiert, die TNF Serumkonzentrationen werden reduziert. Mit der Untersuchung des Verlaufs der NFκB Aktivierung in der Leber wurde überprüft, ob die reduzierten TNF Konzentrationen die hepatische NFκB Aktivierung beeinflussen.

Leberbiopsien von Tieren der 4 Gruppen (siehe Abb. 3.2) wurden zur Isolierung nukleärer Leberproteine verwendet. Die isolierten Proteine wurden mittels Gel-Retentionsanalysen auf Bindungsfähigkeit von NFκB-Konsensus-Oligonukleotiden untersucht.

Aus Abb. 3.7 A geht hervor, dass die Aktivierung von NFκB im Verlauf der nicht therapierten Hepatitis 2h nach ConA Injektion detektierbar ist. Das Maximum der Aktivie-

nung ist 8h nach der Initiierung des Leberschadens erreicht und reduziert sich nach 18h auf das Ausgangsniveau.

Die größeren, langsamer migrierenden Komplexe repräsentieren vornehmlich von NFkB-p65 Homodimere. Die kleineren, schneller laufenden Komplexe dagegen bestehen aus p50/p65 Heterodimeren und p50/p50 Homodimeren (Abb. 3.7 B). Der zeitliche Verlauf korreliert mit dem Konzentrationsmaximum von TNF im Serum der Tiere (siehe Abb. 3.5 roter Graph). ME3738 Vorbehandlung verändert diesen Verlauf.

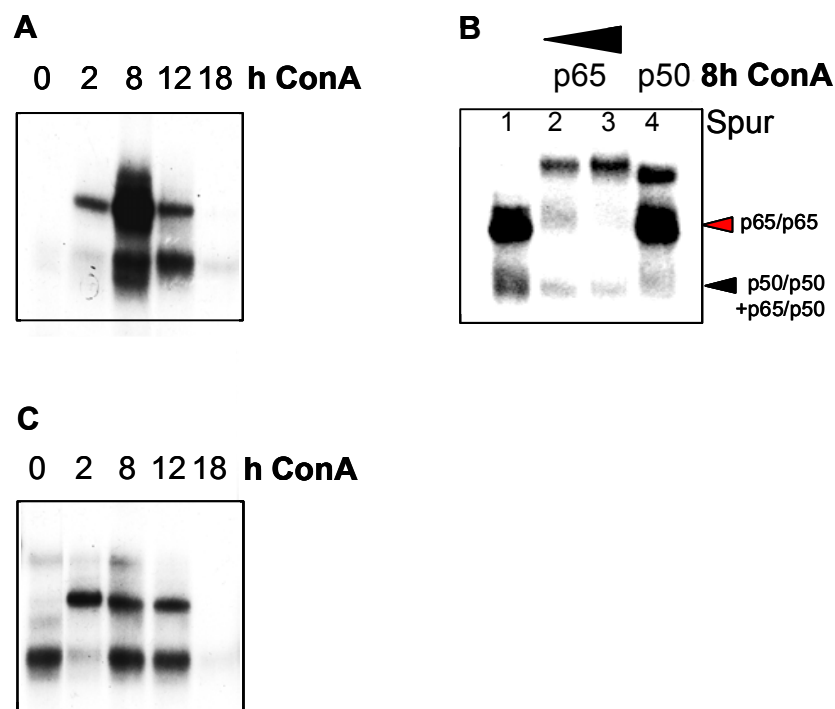


Abb. 3.7: NFkB Gel-Retentionsanalyse nukleärer Proteine ME3738 therapierter und nicht therapierter Tiere: ME3738 induziert NFkB p50. Die NFkB p65 Aktivierung im Verlauf der ConA Hepatitis wird durch die Therapie reduziert.

A) Die ConA Gruppe: Aus den zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Lebern nicht ME3738 therapierter Tiere wurden nukleäre Proteine isoliert und auf Bindung eines radioaktiv markierten NFkB Konsensus-DNA-Oligonukleotids untersucht.

B) p65- bzw. p50-Supershift: Proteine des 8h Zeitpunktes der nicht therapierten Tiere wurden mit spezifisch gegen die p65- oder p50-NFkB-Untereinheit gerichteten Antikörpern inkubiert. Von links nach rechts: Spur 1: kein Antikörper; Spur 2: 1µl p65 Antikörper; Spur 3: 2µl p65 Antikörper; Spur 4: 1µl p50 Antikörper.

C) Die ME3738+ConA Gruppe: Aus zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Lebern ME3738 therapierter Tiere wurden nukleäre Proteine isoliert und auf Bindung eines radioaktiv markierten NFkB Konsensus-DNA-Oligonukleotids untersucht.

Das Maximum der NFkB Aktivierung ist schon 2h nach Con A Injektion erreicht. Verglichen mit den nicht therapierten Tieren, liegt es auf ähnlichem Niveau. Die Menge aktivierter NFkB Komplexe stagniert, und ist 18h nach ConA Injektion nicht mehr detektierbar.

Auffallend ist der starke Unterschied 8h nach ConA Applikation. Zu diesem Zeitpunkt steigen die Serumtransaminasenwerte bei unbehandelter ConA Hepatitis erstmals an. Die ME3738 induzierte Verringerung der NFkB Aktivierung ist assoziiert mit der Inhibition des Leberzellschadens. Ein weiterer Unterschied liegt in der ME3738 induzierten Aktivierung der p50 Homodimere (Abb. 3.7 C, 0h Wert). Die Injektion von ME3738 führt zu nukleärer Translokation der NFkB p50 Untereinheiten. Im späteren Verlauf ist das p50/p50 Signal verglichen mit nicht therapierten Mäusen deutlich schwächer (Abb. 3.7 C).

3.1.4 ME3738 induziert eine verstärkte hepatische STAT3 Aktivierung:

In der Leber wird IL6/gp130 abhängig STAT3 und STAT1 aktiviert⁷⁴. Die intrazelluläre Vermittlung IL6 abhängiger Signale kann somit durch die Untersuchung der hepatozellulären STAT Aktivierung analysiert werden. Mittels Gel-Retentionsanalysen wurde in den folgenden Experimenten die Auswirkung der ME3738 Injektion auf die hepatische STAT Aktivierung untersucht.

In nicht ME3738 therapierter Mäuse, kommt es 2h bis 12h nach ConA Injektion zur STAT3 und STAT1 Aktivierung in der Leber (Abb. 3.8 A). Das langsamer migrierende Signal entspricht gebundenen STAT3 (Abb. 3.8 B). In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass schneller migrierende Komplexe STAT1 entsprechen¹²⁵.

Die ME3738 Therapie verändert den Verlauf der STAT Aktivierung. STAT3 ist bereits zum Zeitpunkt der ConA Injektion detektierbar (Abb. 3.8 C, 0 h).

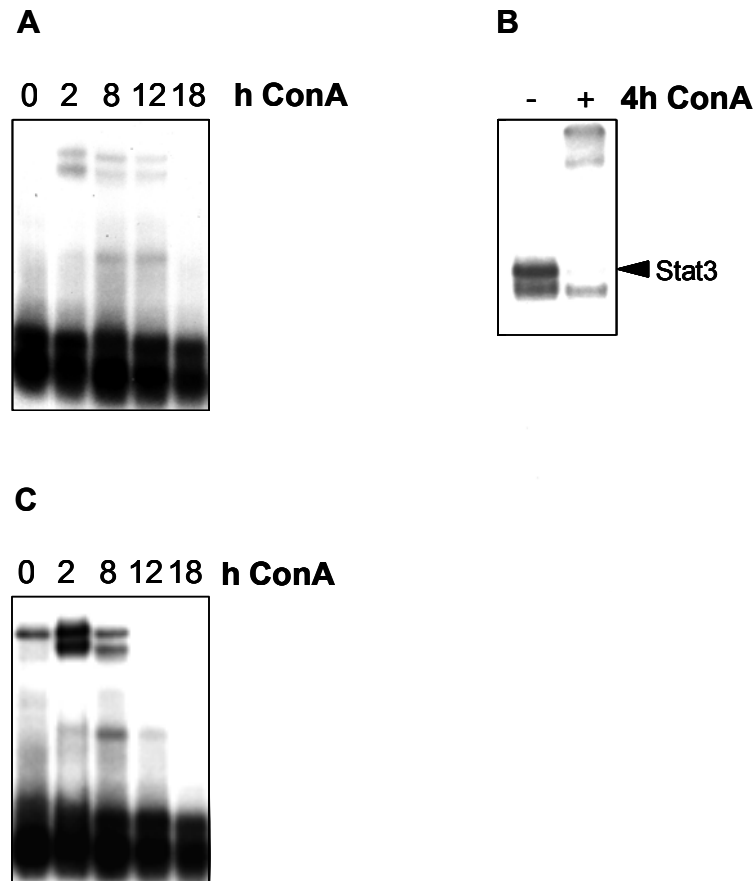


Abb. 3.8: STAT Gel-Retentionsanalyse ME3738 therapierter und nicht therapierter Mäuse: ME3738 Behandlung führt zu einer verstärkten hepatischen STAT Aktivierung im Verlauf der ConA Hepatitis.

A) Die ConA Gruppe: Aus den zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Lebern nicht therapierter Tiere wurden nukleäre Proteine isoliert und auf Bindung eines radioaktiv markierten STAT-Konsensus-DNA-Oligonukleotids untersucht.

B) STAT3 Supershift: Proteine des 4h Zeitpunktes der nicht therapierten Tiere wurden mit STAT3 gerichtete Antikörpern inkubiert. Links: ohne Antikörper; rechts: mit 1 μ l STAT3 Antikörper.

C) Die ME3738+ConA Gruppe: Aus den zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Lebern ME3738 therapierter Tiere wurden nukleäre Proteine isoliert und auf Bindung eines radioaktiv markierten STAT-Konsensus-DNA-Oligonukleotids untersucht.

Die Untersuchung der IL6 Serumkonzentrationen ergab zu diesem Zeitpunkt detektierbare Mengen IL6. ME3738 induziert somit erhöhte IL6 Serumwerte und eine hepatozelluläre STAT3 Aktivierung.

Verglichen mit nicht therapierten Tieren ist 2h und 8h nach Con A Applikation eine verstärkte STAT3- und STAT1-Aktivierung nachweisbar. Im weiteren Verlauf zeigt sich eine verkürzte STAT Aktivierungsphase, verglichen mit nicht ME3738 behandel-

ten Tieren (Abb. 3.8 A (12h) und C (12h)). Dieser Verlauf korreliert mit der schnellen Reduktion der IL6 Serumkonzentrationen (siehe Abb. 3.6 schwarzer Graph).

3.1.5 ME3738 reduziert die ConA induzierte Jun-Kinase-Aktivität:

Das Ausmaß der Con A Hepatitis korreliert mit der Aktivierung der Jun-Kinase (JNK) ²¹. Um die JNK Aktivierung zu ermitteln wurde im folgenden Experiment ein JNK abhängig phosphoryliertes Substrat untersucht. cFOS wird JNK abhängig aktiviert und bildet mit cJUN den Transkriptionsfaktor AP-1, der u. a. bei der Induktion der Zellproliferation eine wichtige Rolle spielt ¹²⁶.

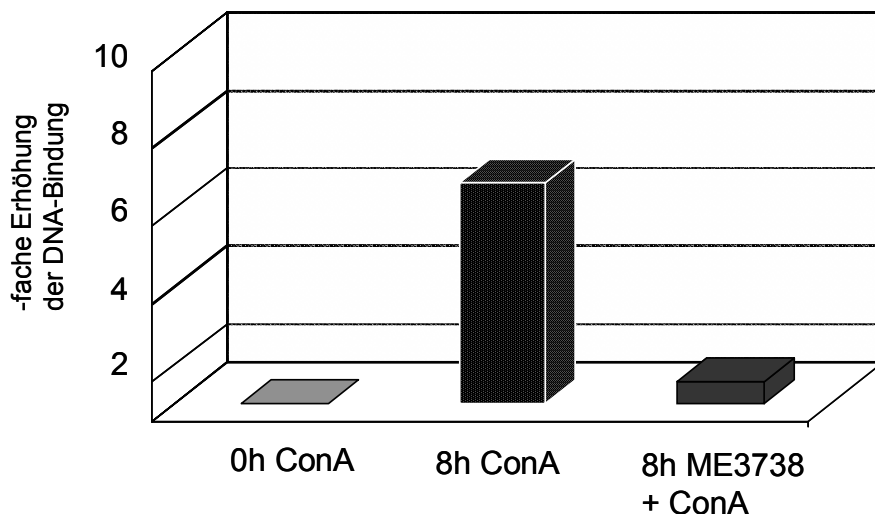


Abb.3.9: cFOS DNA-Bindungsaktivität 8h nach ConA Injektion mit und ohne ME3738 Therapie: ME3738 reduziert die ConA induzierte cFOS Aktivierung auf 1/6 des Wertes der nicht therapierten Tiere.

Aus Lebern ConA oder ME3738+ConA behandelter Mäuse wurden nukleäre Proteine isoliert. Gleiche Mengen Protein wurden mit cFOS Konsensus-Oligonukleotid (an eine 96 Well Platte gebunden) inkubiert.

Die Quantifizierung des eingesetzten Proteins wurde sowohl photometrisch mittels einer BIORAD Reaktion als auch durch Auftrennung gleicher Volumina Proteinlösung im SDS Gel mit anschließender Comassie-Färbung verifiziert.

Mit einem Peroxidase gekoppelten cFOS Antikörper wurden spezifisch DNA-cFOS-Komplexe quantifiziert. Die Absorption wurde photometrisch gemessen. Zur Auswertung wurde der Hintergrund (0h ConA oder 0h ME3738+ConA) als Ausgangswert genommen und die Messergebnisse der 8h Werte dagegen ins Verhältnis gesetzt.

Zur Ermittlung der cFOS Aktivierung wurde ein Assay verwendet, bei dem die Bindung einer cFOS-DNA-Konsensussequenz kombiniert wird mit der Kopplung eines cFOS spezifischen Antikörpers. Das „Mercury-Transfactor-System“ der Firma Clontech ermöglicht die Bestimmung in Form eines ELISA´s. Eine „96´Well-Platte“ ist mit einem cFOS Konsensus-Oligonukleotid beschichtet. Bei der Inkubation mit nukleären Extrakten, die aus Lebergewebe von Tieren der 4 Gruppen isoliert wurden, bindet vorhandenes cFOS und wird in einem 2. Schritt mittels des spezifischen cFOS Antikörpers detektiert.

Abb. 3.9 zeigt, dass die Therapie mit ME3738 zu einer deutlichen Reduktion der Aktivierung von cFOS im Verlauf der ConA Hepatitis führt. Der 8h Wert wurde gewählt, da zu diesem Zeitpunkt das Maximum der JNK Aktivierung im Verlauf der ConA Hepatitis vorliegt²¹.

3.2 ME3738 Injektion führt zu einer Erhöhung der IL6 Serumkonzentrationen:

Um die Mechanismen der Grundlagen der ME3738 Protektion einordnen zu können, wurde zunächst die Kinetik der IL6 Sekretion analysiert.

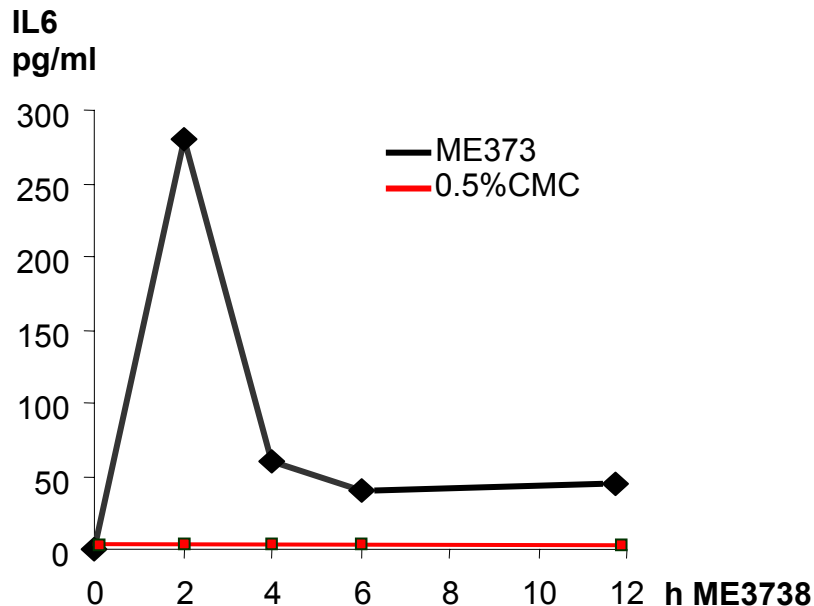


Abb. 3.10: Der zeitliche Verlauf der ME3738 induzierten Erhöhung der IL6 Serumkonzentrationen: ME3738 Injektion führt beginnend mit 2h bis 12h nach Applikation zu einer Erhöhung der IL6 Konzentrationen im Serum. Das Lösungsmittel 0,5% CMC hat keine Auswirkung auf die IL6 Serumwerte.

Pro Zeitpunkt wurden das Serum von 3 -5 ME3738 (40mg/kg) behandelten Mäusen anteilsgleich gemischt und mittels ELISA die Konzentrationen murinen IL6 untersucht.

Aus Abb. 3.10 geht hervor, dass die Injektion von ME3738 zu einer schnellen Erhöhung der IL6 Serumwerte führt. Schon 2h nach ME3738 Applikation können maximale IL6 Werte detektiert werden. Nach 4h reduzieren sich die IL6 Konzentrationen im Serum, sind aber bis zu 12h nach Injektion nachweisbar.

Die Kinetik der IL6 Sekretion korreliert mit der hepatischen Phosphorylierung und nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 (Abb. 3.11). Um auszuschließen, dass Lösungsmittelleffekte vorliegen, wurde parallel zur ME3738 Injektion eine gleiche Anzahl von Tieren mit 0.5% CMC behandelt. STAT3 Aktivierung war bei diesen Tieren nicht detektierbar (Abb. 3.11).

3.2.1 Als Folge der erhöhten IL6 Serumkonzentrationen wird eine STAT3 abhängige Signalkaskade aktiviert:

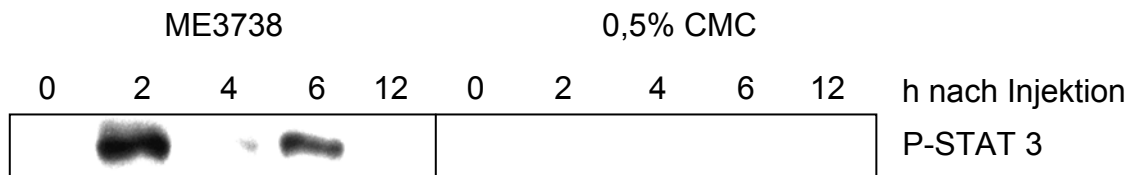


Abb. 3.11: P-STAT Western ME3738 oder 0,5%CMC behandelte Mäuse: ME3738 induziert 2h nach Applikation die Aktivierung von STAT3 in der Leber.

3-5 Tiere pro Zeitpunkt wurden mit 40mg/kg ME3738 oder gleichem Volumen 0,5%CMC injiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet und aus den Lebern wurden nukleäre Proteine isoliert. Die Lebern identisch behandelte Tiere wurden zu gleichen Gewichtsanteilen eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einem gegen phosphoryliertes STAT3 gerichteten Antikörper.

Eine wichtige Folge der IL6/STAT3 abhängigen Signaltransduktion in der Leber ist die Induktion der Akut Phase Reaktion⁵⁸.

Ein im Rahmen dieses Abwehrmechanismus transkriptionell reguliertes Gen ist SAA2⁵⁸. Um die Auswirkungen der ME3738 Therapie auf eine potentiell aktivierte Expression von Akut Phase Proteinen zu untersuchen, wurde SAA2 als Marker einer IL6 abhängigen Akut Phase Reaktion analysiert.

ME3738 induziert eine massive Expression von SAA2. 2h nach Injektion von ME3738 sind erstmals SAA2-Transkripte im Northern-Blot detektierbar (Abb. 3.12 A). Das Maximum der Transkription ist nach 4h erreicht. Der zeitliche Verlauf korreliert mit dem der IL6 Sekretion und STAT3 Aktivierung (siehe Abb. 3.10 und 3.11). Bis 12h nach Injektion ist SAA2 nachweisbar.

Auch auf Proteinebene ist die ME3738 abhängige SAA2 Induktion nachweisbar. Ausgehend von ca. 20µg/ml vor der ME3738 Injektion steigen die Serumkonzentrationen von SAA2 6h nach Beginn der Behandlung auf ca. 1800µg/ml an (Abb. 3.12 B). Bis zum Ende des untersuchten Zeitraums, 12h nach ME3738 Applikation, ist das Protein detektierbar.

3.2.2 Me3738 induziert die Expression der Proteine SAA2 und Hemopexin:

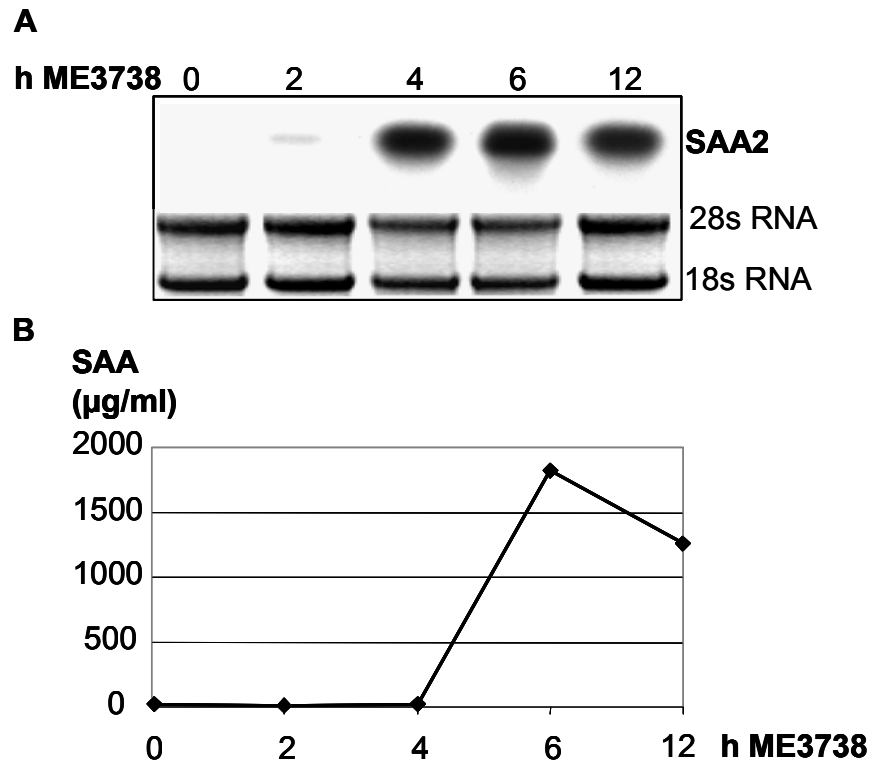


Abb. 3.12: Untersuchung der Me3738 induzierten SAA2 Expression: ME3738 induziert eine massive Expression von SAA2.

A) Northern-Blot Analyse der RNA ME3738 stimulierter Mäuse: Pro Zeitpunkt wurde die isolierte RNA von 3-5 Tieren zu gleichen Teilen gemischt, im denaturierenden Agarose Gel aufgetrennt und mit einem radioaktiv markierten, zur SAA2 cDNA Sequenz komplementären DNA Fragment, hybridisiert. Die Abbildung der im Agarose Gel aufgetrennten 28s und 18s RNA, dient der Kontrolle das gleiche Mengen RNA eingesetzt wurden.

B) SAA ELISA: Die Seren ME3738 stimulierter Tiere wurden pro Zeitpunkt zu gleichen Teilen gemischt und auf die Konzentration von SAA Protein untersucht.

3.2.3 In der Leber und Milz ist keine ME3738 induzierbare IL6 Transkription detektierbar:

Der Mechanismus der ME3738 induzierten Freisetzung von IL6 ins Serum ist nicht geklärt. Um eine Induktion der IL6 Transkription zu analysieren wurden Northern Blot Analysen der RNA ME3738 behandelte Mäuse durchgeführt.

Aus verschiedenen Geweben ME3738 behandelte Tiere wurde zu verschiedenen Zeitpunkten RNA isoliert, und auf das Vorhandensein von IL6 mRNA untersucht.

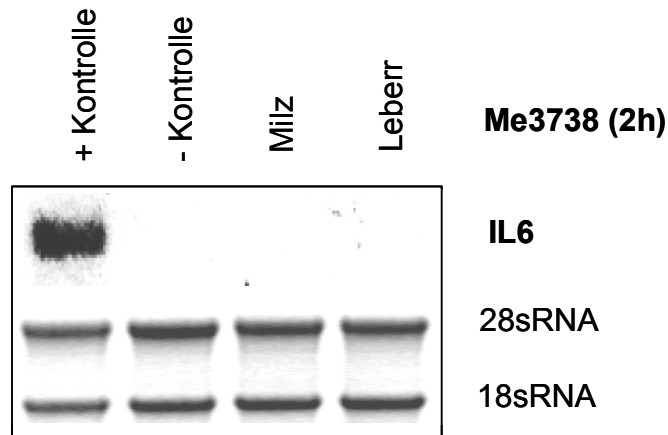


Abb. 3.13: IL6 Northern-Blot Analyse ME3738 stimulierter Mäuse: ME3738 induziert keine Transkription des IL6 Gens in Leber und Milz.

Pro Zeitpunkt wurde die isolierte RNA von 3-5 Tieren zu gleichen Teilen gemischt, im denaturierenden Agarose Gel aufgetrennt und mit radioaktiv markierten IL6 cDNA Fragment hybridisiert. Als Positivkontrolle diente RNA aus der Leber LPS stimulierter Tiere. Als Negativkontrolle diente RNA aus den Lebern mit 0,5% CMC behandelte Mäuse. Die Abbildung der 28s und 18s RNA dient als Kontrolle, dass gleiche Mengen RNA analysiert wurden.

Es konnte keine IL6 Transkripte nachgewiesen werden. Als Beispiel ist hier eine Northern-Blot Analyse von Tieren abgebildet, aus deren Leber und Milz 2h nach ME3738 Injektion RNA isoliert wurde. Auch sensitivere „Real-Time-PCR“ Untersuchungen ME3738 stimulierter Tiere ergaben keine Aktivierung des IL6 Gens in Leber und Milz (persönliche Mitteilung Dr. Nishijama, Meiji).

Für die weiteren Untersuchungen des Protektionsmechanismus stand nunmehr der Nachweis im Vordergrund, ob die ME3738 induzierte IL6 Signaltransduktion tatsächlich für die Inhibition der ConA Hepatitis verantwortlich ist.

3.3 Die Wirkung der ME3738 Injektion bei IL6^{-/-} Mäusen und hepatozytenspezifischen gp130 knockout Tieren:

Um die Abhängigkeit der ME3738 induzierten Protektion im Con A Modell vom IL6/gp130 Signaltransduktionsweg zu verifizieren, wurden für die folgenden Experimente IL6 knockout Mäuse, und hepatozytenspezifische gp130^{-/-}-Mäuse verwendet. IL6^{-/-} Tiere können aufgrund des deletierten IL6 Gens das Zytokin nicht synthetisieren. Für die Charakterisierung der durch ME3738 Therapie ausgelösten protektiven Signalwege waren diese Tier notwendig, da andere Zytokine über den Rezeptor gp130 die Induktion der hepatozellulären STAT3 Signalkaskade initiieren könnten. Zusätzlich wurden hepatozytenspezifische gp130 knockout Mäuse generiert. Gp130-Defizienz ist letal. Die Tiere sterben in Abhängigkeit des genetischem Stammhintergrundes, zwischen Tag 12,5 p. c. und postnatal⁴⁵. Durch die Verwendung hepatozytenspezifischer gp130 knockout Mäuse kann ermittelt werden, ob der ME3738 induzierte Schutz auf Ebene der Hepatozyten gp130 abhängig vermittelt wird. Diese Frage ist von Bedeutung, da geklärt werden sollte, ob die ME3738 Therapie eine Abwehr der Leberzelle gegenüber den Folgen entzündlicher Ereignisse induziert oder ob die initialen Ereignisse der ConA Hepatitis, wie z. B. die Aktivierung bestimmter Immunzellen modelliert werden.

3.3.1 Die hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäuse (alpCre⁺/gp130loxP):

Bei diesen Mäusen ist das Exon 16 von zwei loxP Sequenzen flankiert ⁷⁵. Das Exon 16 kodiert für die Transmembrandomäne des gp130 Moleküls. Ohne diese Domäne wird kein membranständiger Rezeptor gebildet. loxP Sequenzen sind 34 Basen umfassende Erkennungssequenzen für die DNA-Rekombinase des Bakteriophagen -P1. Ein DNA-Abschnitt, der von zwei loxP-Sequenzen flankiert ist, wird von der DNA-Rekombinase entfernt.

Um die Gewebsspezifität der Deletion des gp130 Rezeptors zu gewährleisten, wurden homozygote gp130loxP Tiere mit Albumin-Cre transgenen Mäusen gekreuzt. Das Protein Cre-Rekombinase wird in Albumin-Cre Mäusen unter der Kontrolle eines Albumin Promotors expremiert. Die Albumin Expression ist hepatozytenspezifisch. Die Expressionsstärke der Rekombinase wird durch Enhancer Elemente im „alp-Cre-Genloкус“ verstärkt, um eine effektive Entfernung loxP flankierter Elemente zu gewährleisten (Abb. 3.14).

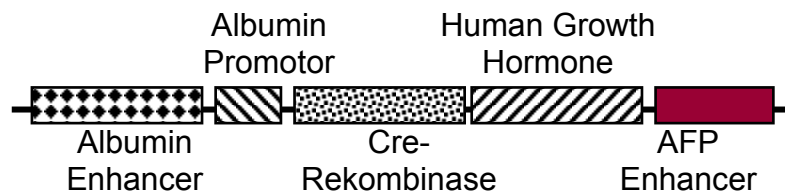


Abb.3.14: Organisation des alp-Cre-Konstrukts.

Ergebnis dieser Kreuzung sind alpCre/gp130loxP Mäuse. Die Tiere sind normal lebensfähig und zeigen keine Abnormalitäten. Der Albumin Promotor wird ab Embryonaltag 10,5 aktiviert. Mittels PCR Analysen wurde die Verkürzung des gp130 Allels auf Ebene genomischer DNA nachgewiesen (Abb.3.15). Die Detektion des verkürzten 1kb Fragment markiert den Beginn der Aktivität der Cre-Rekombinase. Das nicht trunkierte gp130 Fragment ist 3,2 kb groß (Streetz et. al. unveröffentlichte Ergebnisse).

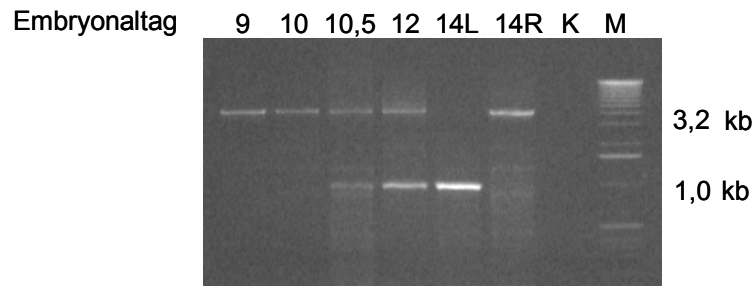


Abb.3.15: PCR zum Nachweis von Exon 16 im gp130 Genlokus von *alpCre/gp130loxP* transgenen Mausembryonen: Am Embryonaltag 10,5 ist erstmals verkürztes gp130 Fragment detektierbar. Der Vergleich Tag 14 Leber zu Tag 14 Restembryo zeigt die Gewebsspezifität der Deletion.

Aus Gesamtembryonen der Embryonalstage 9,10,12 wurde aus der Leber der Tiere genomische DNA isoliert und in einer PCR auf Wildtyp bzw. verkürztes gp130 Fragment untersucht. Am Embryonaltag 14 wurde aus der Leber (14L) und dem Restembryo (14R) DNA isoliert und äquivalent verfahren. Bei der Kontrolle (K) wurde die PCR mit H₂O als Template durchgeführt.

Die 3,3 kb Bande ist das Wildtyp gp130 Fragment; die 1kb Bande ist trunkeierte gp130 cDNA. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Konrad Streetz zur Verfügung gestellt.

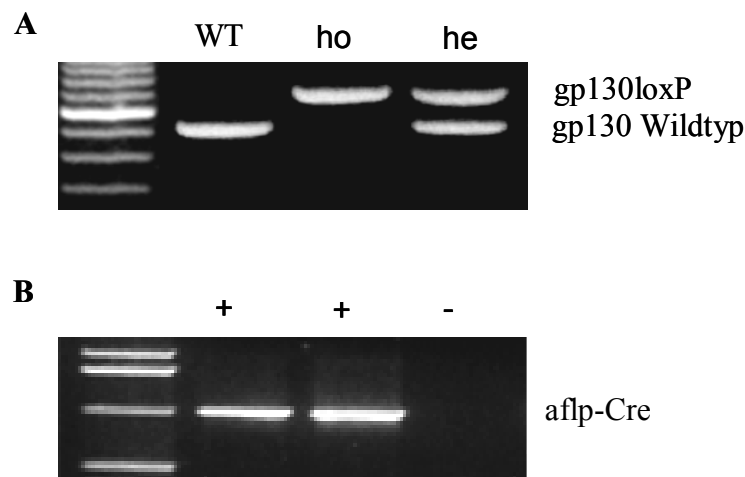


Abb. 3.16: Beispiel einer PCR basierenden Genotypisierung der *alpCre* Mäuse

A) gp130 loxP PCR: Die obere Bande entspricht der loxP flankierten gp130 Sequenz, die untere der Wildtyp Sequenz

B) Cre-PCR: Das Cre-Rekombinase Transgen wird durch die ca. 1kb große Bande verifiziert
 WT= Wildtyp, ho= homozygot gp130loxP, he= heterozygot gp130loxP

Die gp130 Deletion bzw. der Genotyp der Mäuse kann auf genomischer Ebene mittels Southern-Blot Analyse und spezifischen PCR's nachgewiesen werden.

Alle für die Experimente eingesetzten Tiere wurden mittels PCR auf ihren Genotyp untersucht. Es wurden für jedes genutzte Tier PCR Analysen für das Cre-

Rekombinase Gen und auf Homozygotie der loxP Sequenzen im gp30 Genlokus durchgeführt (Beispiel: Abb. 3.16).

3.3.2 Die ME3738 induzierte Erhöhung der IL6 Serumkonzentrationen ist in den hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen (alfpCre⁺/gp130loxP) nachweisbar.

ME3738 induziert in BALB/C Mäusen einen Anstieg der IL6 Serumwerte. Da die alfpCre⁺/gp130loxP Tiere einen anderen Stammhintergrund (NMRI) aufweisen, wurden in allen folgenden Experimenten Cre-negative Tiere als Kontrollen eingesetzt. In Bezug auf das gp130 loxP Allel sind die Kontrolltiere identisch.

Bei IL6 knockout Tieren konnte erwartungsgemäß keine Konzentrationserhöhung des Zytokins im Serum nach ME3738 Therapie nachgewiesen werden. Dagegen führt die ME3738 Therapie in hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Tieren, analog zu BALB/C Mäusen, zu einem Anstieg von IL6 im Serum (Abb. 3.17).

2h nach ME3738 Injektion ist das Maximum der IL6 Serumkonzentration erreicht. Später fallen die IL6 Konzentrationen ab.

Ob der Unterschied zum Zeitpunkt 2h nach Me3738 Injektion einen signifikante Differenz darstellt, kann mit der hier durchgeführten Messmethode nicht sicher beantwortet werden. Eine Wiederholung des Experiments mit einer größeren Anzahl Tiere wurde aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit dieser Mäuse zunächst nicht durchgeführt.

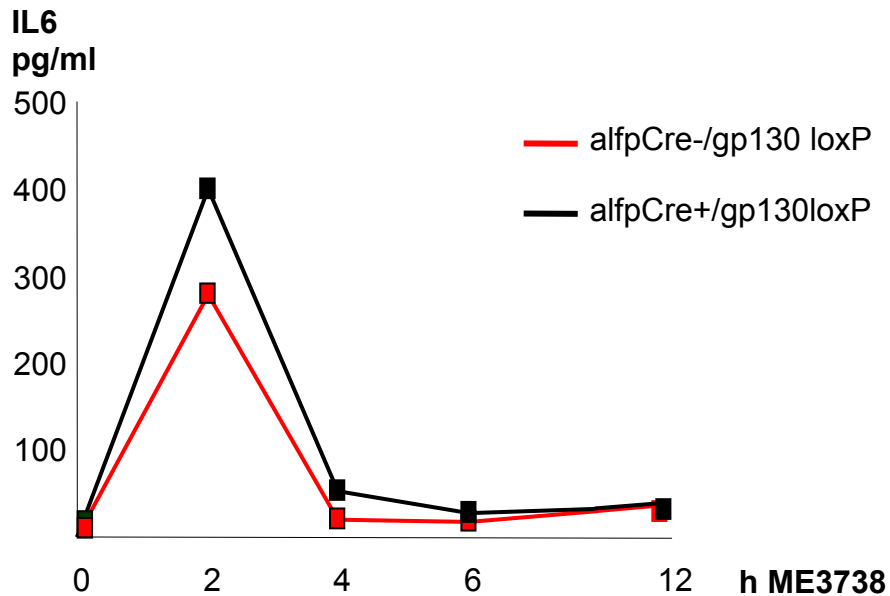


Abb. 3.17: Analyse der IL6 Konzentrationen im Serum ME3738 injizierter Mäuse: Der zeitliche Verlauf der Erhöhung der IL6 Serumkonzentrationen ist durch die gp130 Deletion nicht verändert.

Seren von 3-5 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt wurden zu gleichen Teilen vereinigt und die IL6 Konzentrationen wurden mittels ELISA ermittelt.

Die Kontrolltiere (roter Graph) weisen kein Cre-Transgen auf. Die hepatozytenspezifischen gp130 -/- Tiere exprimieren das Cre-Transgen (schwarzer Graph).

3.3.3 Die ME3738 abhängige STAT3 Aktivierung ist in IL6-/- Mäusen und hepatozytenspezifischen gp130 -/- Mäusen blockiert:

Die Auswirkungen der IL6 und gp130 Deletion auf die ME3738 induzierte STAT3 Aktivierung zeigen Abb. 3.18 und Abb. 3.19.

Sowohl in IL6-/- als auch in hepatozytenspezifischen gp130-/- Mäusen ist die ME3738 induzierte STAT3 Aktivierung in der Leber nicht mehr detektierbar (Abb. 3.18 und 3.19). Dagegen wird STAT1 durch ME3738 in den alfpCre+/gp130loxP Tieren weiterhin induziert (Abb.3.18 A). In IL6 knockout Mäusen ist kein STAT1 nachweisbar (Abb. 3.19 A).

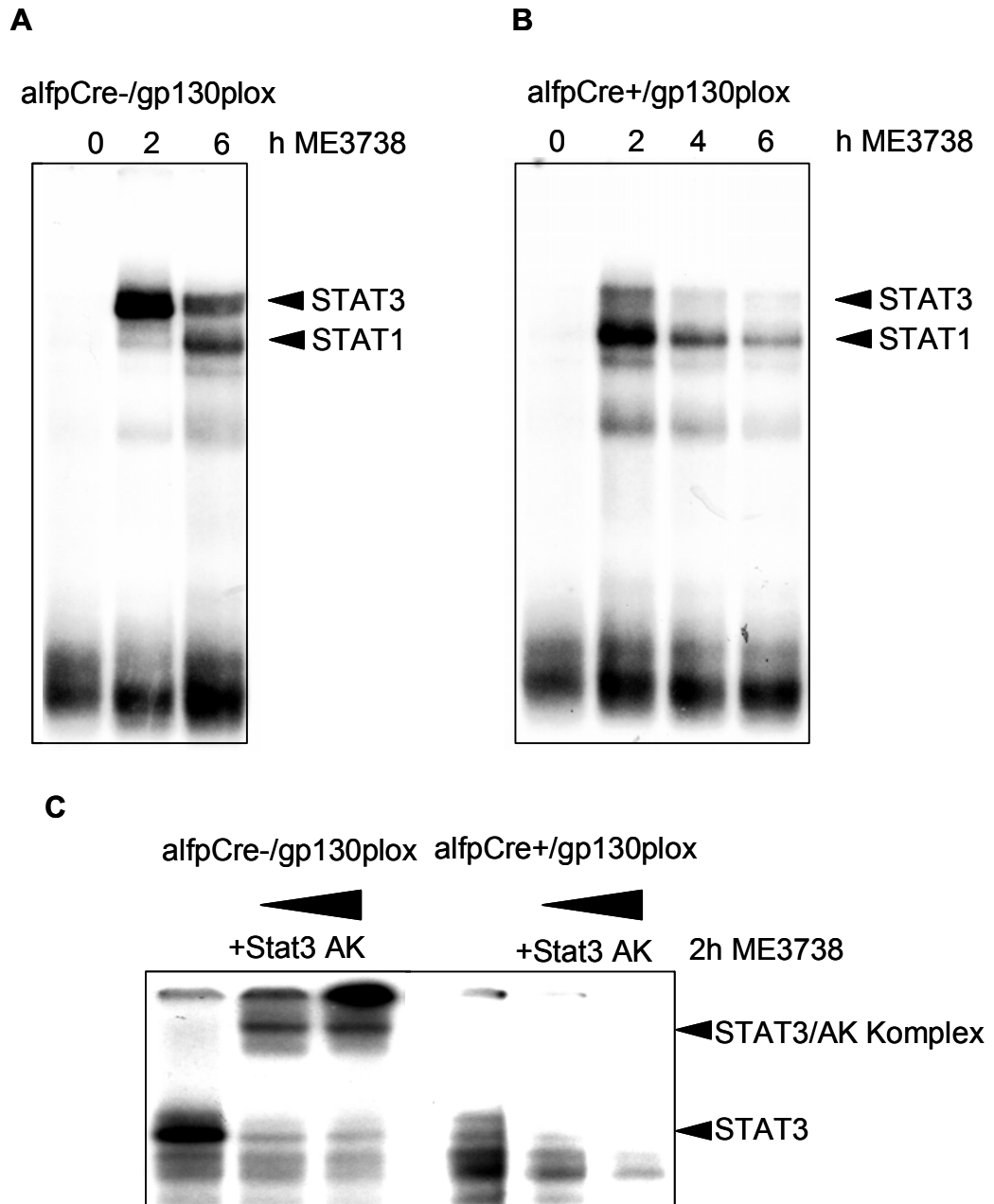


Abb. 3.18: STAT3 Gel-Retentionsanalyse ME3738 injizierter alfpCre/gp130 loxP Mäuse: In Wildtyp Tieren (alfpCre-/gp130loxP induziert ME3738 STAT3 und STAT1; in den hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Tieren ist STAT3 nicht detektierbar.

A): STAT3 Gel-Retentionsanalyse nukleärer Leberproteine ME3738 injizierter Wildtyp Tiere: alfpCre-/gp130loxP. B): STAT3 Gel-Retentionsanalyse nukleärer Leberproteine ME3738 injizierter hepatozytenspezifischer gp130^{-/-} Tiere: alfpCre+/gp130loxP. C) STAT3 Supershift: Alle Tiere wurden ME3738 injiziert und nach 2h getötet: Spur 1: alfpCre-/gp130loxP ohne STAT3 Antikörper; Spur 2: alfpCre-/gp130loxP +1µl STAT3 Antikörper; Spur 3: alfpCre-/gp130loxP +2µl STAT3 Antikörper; Spur 4: alfpCre+/gp130loxP ohne STAT3 Antikörper; Spur 5: alfpCre+/gp130loxP +1µl STAT3 Antikörper; Spur 6: alfpCre+/gp130loxP +1µl STAT3 Antikörper.

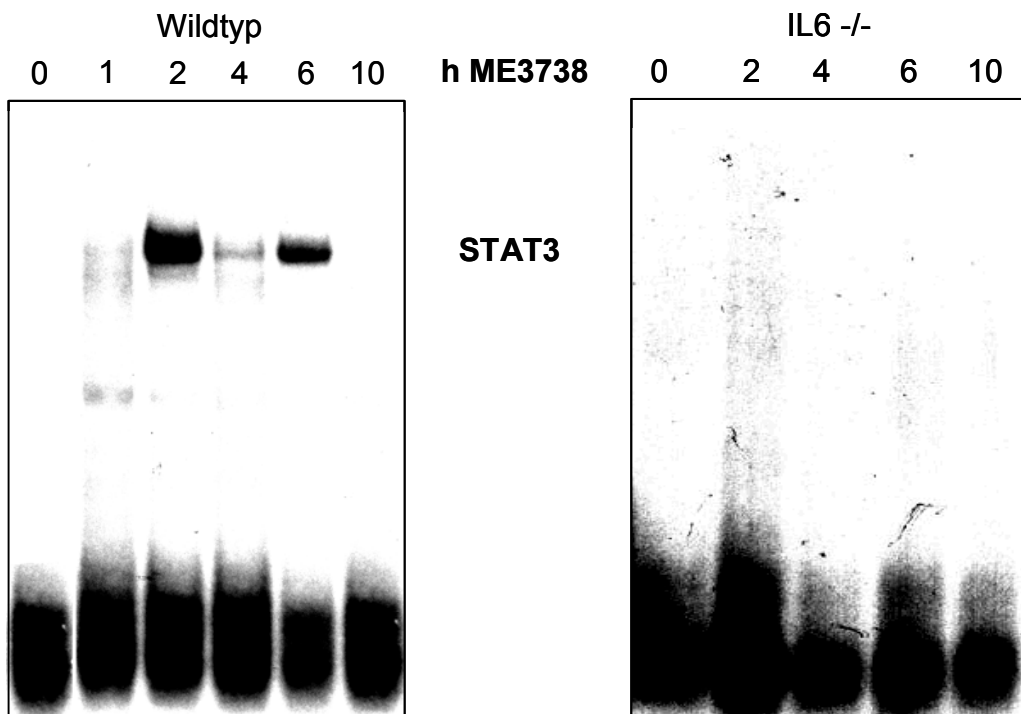


Abb. 3.19: STAT3 Gel-Retentionsanalyse nukleärer Proteine ME3738 injizierter IL6^{-/-} Mäuse und Wildtyp Mäuse: ME3738 induziert bei IL6^{-/-} Mäusen keine STAT3- Aktivierung. Dagegen sind bei Wildtyp Mäusen nach 2h STAT3 Komplexe nachweisbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch ME3738 induziertes IL6, gp130 abhängig die STAT3 Aktivierung in Hepatozyten bewirkt.

3.3.4 Die durch ME3738 Injektion induzierte Akut Phase Reaktion ist IL6/gp130 abhängig:

Die Analyse der SAA2 und Hemopexin Expression macht deutlich, dass für die Me3738 abhängige Aktivierung dieser Gene, sowohl IL6, als auch der hepatozytär exprimierte gp130 Rezeptor essentiell ist. BALB/C Tiere zeigten 12h nach Beginn der ME3738 Behandlung eine starke Expression von SAA2. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Experimenten der 12h Zeitpunkt für die Überprüfung der Induktion der Akut Phase Reaktion herangezogen.

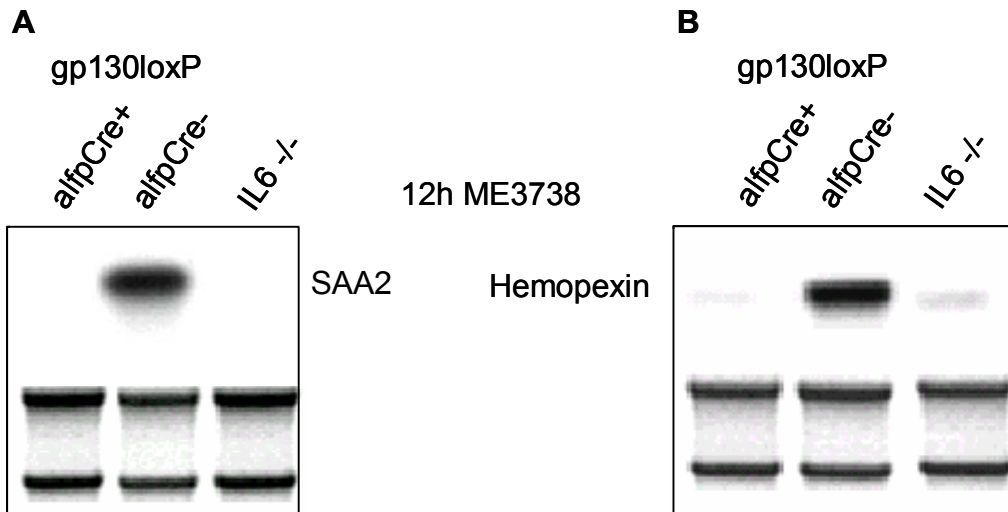


Abb. 3.20: SAA2 und Hemopexin Northern Analysen 12h ME3738 stimulierter Wildtyp, hepatozytenspezifischer gp130^{-/-}, und IL6^{-/-} Mäuse: Sowohl in hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen, als auch in IL6^{-/-} Mäusen induziert ME3738 keine Transkription der Akut Phase Genen SAA2 und Hemopexin.

A) Northern-Blot Analyse der RNA ME3738 stimulierter Mäuse: Pro Zeitpunkt wurde die aus Lebergewebe isolierte RNA von 3-5 Tieren zu gleichen Teilen gemischt, im denaturierenden Agarose Gel aufgetrennt und mit einem radioaktiv markierten SAA2-cDNA Fragment hybridisiert. Die Abbildung der im Agarose Gel aufgetrennten 28s und 18s RNA, dient als Kontrolle das gleiche Mengen RNA analysiert wurden.

Wildtyp = alfpCre⁻/gp130 loxP; hepatozytenspezifische gp130^{-/-} = alfpCre⁺/gp130 loxP; und IL6^{-/-}.

B) Hemopexin Northern Bot Analyse der RNA ME3738 stimulierter Mäuse: Pro Zeitpunkt wurde die aus Lebergewebe isolierte RNA von 3-5 Tieren zu gleichen Anteilen gemischt und der Beschreibung A) entsprechend analysiert.

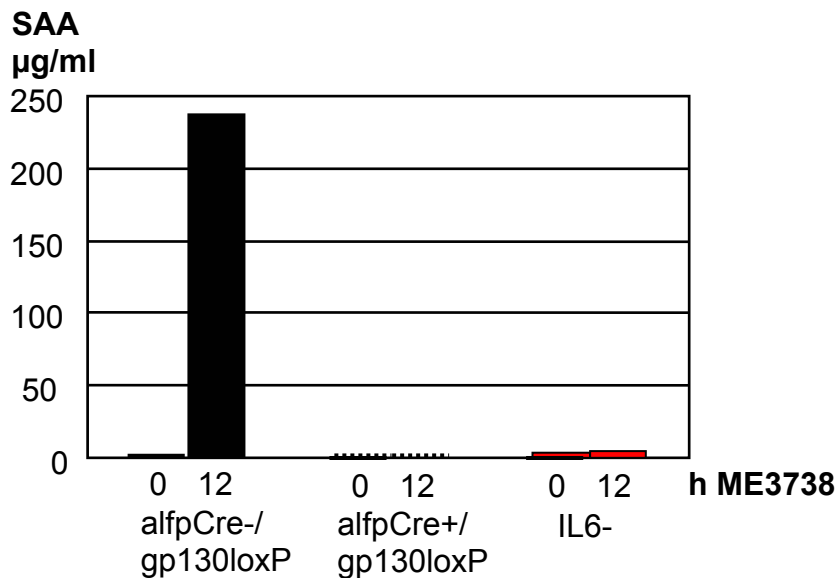


Abb. 3.21: SAA ELISA: Weder in hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen noch in IL6^{-/-} Mäusen induziert ME3738 Proteinexpression von SAA2.

Die Seren ME3738 stimulierter Tiere aus Abb. 3.20 wurden zu gleichen Teilen gemischt. Die Konzentrationen von SAA Protein wurden mittels ELISA analysiert.

Sowohl das Fehlen von IL6 als auch die Deletion des Rezeptors gp130 in Hepatozyten führt zu einer ausbleibenden mRNA Expression von SAA2 und Hemopexin (Abb. 3.20 A und B).

Folge ist eine Inhibition des ME3738 verursachten Anstiegs der SAA2 Proteinexpression. Bei IL6^{-/-} Mäusen und hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Tieren kann kein Anstieg der SAA Serumkonzentration detektiert werden (Abb. 3.21).

3.3.5 ME3738 induziert IL6 abhängig die nukleäre Translokation von NFκB p50 in nicht-parenzymatischen Leberzellen:

Die Analyse der NFκB Aktivierung im Verlauf der ConA induzierten Hepatitis zeigte, dass ME3738 Therapie zu einer Induktion der p50 Untereinheit führt. Zum Zeitpunkt der Initiierung der Hepatitis waren bei ME3738 behandelten Tieren, im Gegensatz zu nicht therapierten Mäusen, DNA bindende p50 Komplexe nachweisbar (Abb. 3.7).

Um den Verlauf, die IL6 Abhängigkeit und die Zelltypspezifität der Aktivierung zu analysieren, wurden Wildtyp-, IL6^{-/-} und hepatozytenspezifische gp130^{-/-} Mäuse mit ME3738 behandelt und auf NFκB Induktion in der Leber untersucht.

Behandlung von Wildtyp Mäusen führt ab 2 h nach ME3738 Injektion zu einer p50 Translokation. Die Aktivierung ist bis 6 h nach Beginn der Behandlung nachweisbar (Abb. 3.22 A). Zu späteren Zeitpunkten waren keine p50 Komplexe detektierbar. Im Rahmen der ConA Therapie wird ME3738 14 h und 2 h vor ConA Applikation injiziert. Die Detektion von p50 Untereinheiten zum Zeitpunkt 0 h bei der Analyse der ConA Hepatitis wird durch diesen zeitlichen Verlauf bestätigt.

Die Aktivierung ist IL6 abhängig. Bei ME3738 behandelte IL6^{-/-} Tieren ist keine p50 Aktivierung nachweisbar (Abb. 3.22B). Die Analyse der hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäuse verdeutlicht, dass diese IL6 abhängige p50 Induktion in nicht hepatozytären Zellen induziert wird. Der gp130 Rezeptor ist das einzige bislang bekannte Molekül, das IL6 abhängige Signale intrazellulär vermittelt. Me3738 Stimulation von hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen führt zu einer Aktivierung von p50 Untereinheiten. Geht man davon aus, dass dieser Effekt IL6 und gp130 abhängig vermittelt wird, so muss die Aktivierung in nicht-parenzymatischen Leberzellen stattfinden.

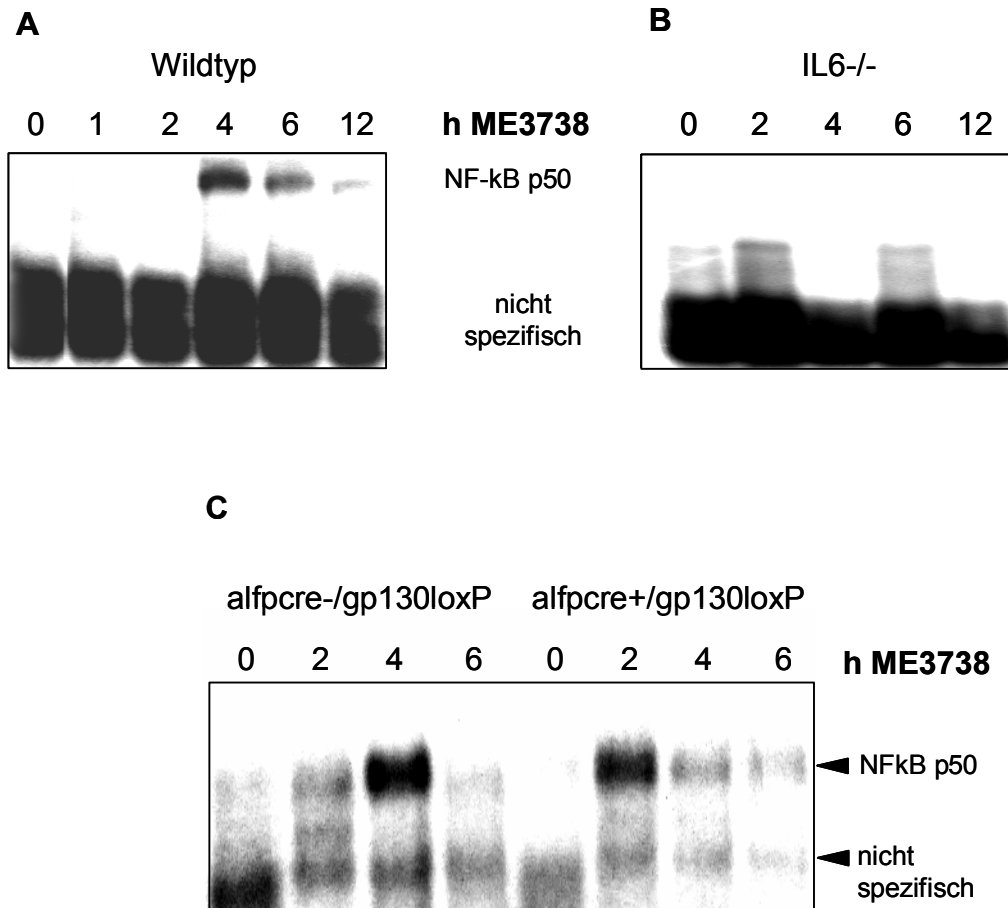


Abb. 3.22: Gel Retentionsanalyse der ME3738 induzierten NfκB Aktivierung in Wildtyp, IL6-/- und hepatozytenspezifischen gp130-/- Mäusen:

Allen Tieren wurde 40mg/kg ME3738 subkutan injiziert. Die Tiere wurden zum angegebenen Zeitpunkt getötet. Die Leber wurde entnommen und die nukleäre Proteine wurden isoliert. Die Proteinextrakte wurden auf NfκB-Konsensus-Oligonukleotid bindungsfähige Komplexe untersucht.

A) BALB/C Mäuse. B) IL6-/- Mäuse. C) Hepatozytenspezifische gp130-/- Mäuse (alfpcre+/gp130loxP) und die Wildtyp Kontrolltiere (alfpcre-/gp130loxP).

3.4 Bei IL6-/- Tieren reduziert ME3738 Therapie die ConA induzierten Leberschäden nicht:

Beide knockout Stämme (IL6-/- und alfpCre+/gp130loxP) wurden entsprechend den BALB/C Mäusen einer ME3738 Therapie unterzogen. Den Tieren wurde 14 h und 2 h vor ConA Injektion jeweils 40mg/kg ME3738 subkutan verabreicht.

Da IL6-/- und alfpCre+/gp130loxP Tiere einen unterschiedlichen Stammhintergrund aufweisen, wurde für jeden Stamm zunächst die optimale ConA Dosis ermittelt.

Bei den IL6 knockout Mäusen wurde 25mg/kg ConA injiziert. Höhere Dosen erwiesen sich als letal, geringere ConA Konzentrationen führten nur zu einem leichten Anstieg der Transaminasenaktivität im Serum.

Injiziert man 25 mg/kg ConA, so steigt die Aktivität der Serumtransaminasen 6 h nach ConA Injektion stark an, und erreicht bei 24 h das Maximum (Abb.3.22 A/B roter Graph).

ME3738 Therapie hat bei IL6-/- Tieren keine Auswirkung auf den Verlauf der Serumtransaminasenaktivität (Abb. 3.23 A/B schwarzer Graph). Im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen wirkt die ME3738 Therapie nicht protektiv (vergleiche Abb. 3.3).

Viele der IL6 knockout Mäuse starben nach 24 h. Das Maximum der Transaminasenwerte ist 24 h nach ConA Injektion erreicht. Zu diesem Zeitpunkt setzt bei Wildtyp Tieren schon eine Reduktion der Werte ein (vergleiche Abb. 3.3). Möglicherweise deuten diese Unterschiede auf eine gestörte Regeneration der IL6 -/- Mäuse.

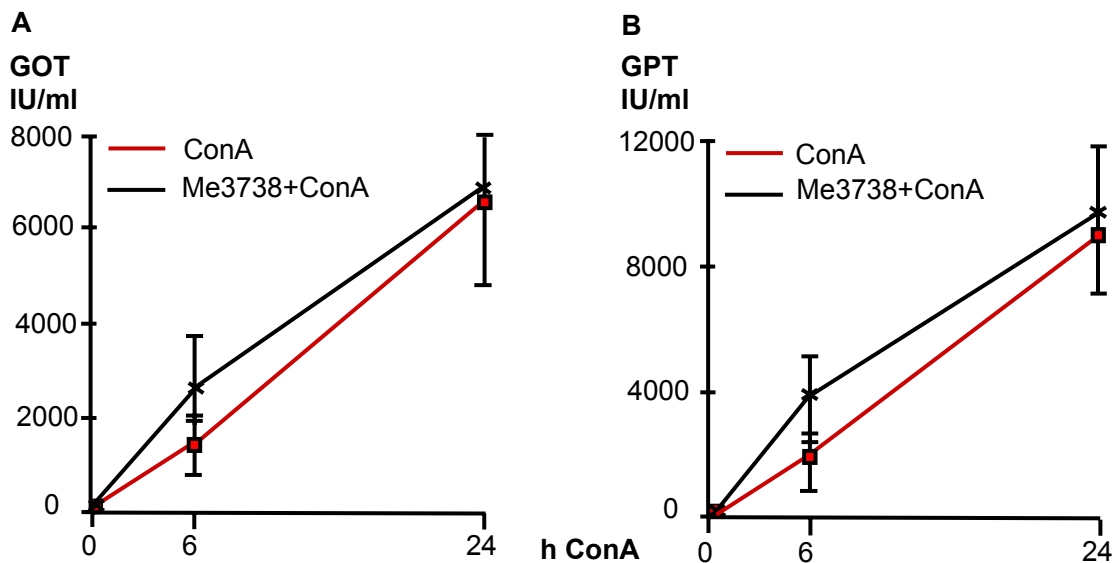


Abb. 3.23: Die Aktivität der Serumtransaminasen GOT und GPT bei IL6-/- Mäusen, nach ConA Injektion: ME3738 Therapie hat bei IL6-/- Mäusen keinen Einfluss auf den Verlauf der Leberschädigung nach ConA Injektion

Allen Tiere wurde 25mg/kg ConA intravenös injiziert. Pro Zeitpunkt und Gruppe wurden 3-5 IL6-/- Mäuse in die Erhebung der Messergebnisse einbezogen. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren retroorbital Blut entnommen, und das Serum auf GOT (A) bzw. GPT (B) Aktivität untersucht.

3.4.1 ME3738 Behandlung verursacht keine verringerte Aktivität der Serumtransaminasen bei hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen im Verlauf der ConA Hepatitis:

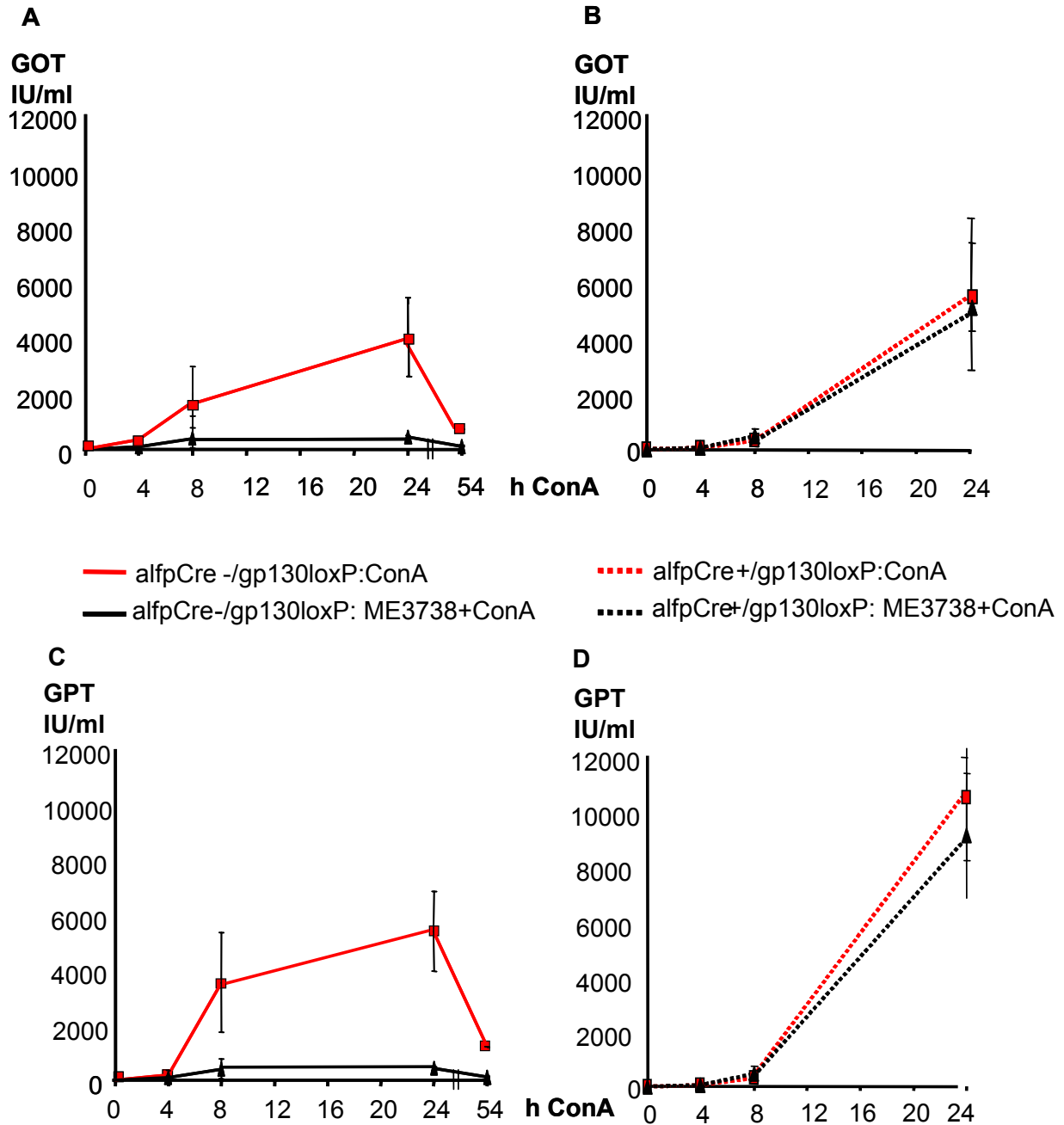


Abb.3.24: Die Aktivität der Serumtransaminasen GOT und GPT bei hepatozytenspezifische gp130^{-/-} (alfpCre^{+/+}/gp130loxP) im Vergleich zum Wildtyp Mäusen: ME3738 Therapie hat bei hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen keinen Einfluss auf den Verlauf der Leberschädigung nach ConA Injektion.

Allen Tiere wurde 20mg/kg ConA intravenös injiziert. Pro Zeitpunkt und Gruppe wurden 4-6 Mäuse in die Erhebung der Messergebnisse einbezogen. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren retroorbital Blut entnommen, und das Serum auf GOT (A/B) bzw. GPT (C/D) Aktivität untersucht.

Bei *alfpCre/gp130loxP* Tieren erwies sich für die Überprüfung der ME3738 vermittelten Protektion eine ConA Dosis von 20mg/kg als geeignet.

Höhere Dosen waren für die meisten Tiere schon zu frühen Zeitpunkten letal. Geringere Dosen führten nur zu schwachen Erhöhungen der Transaminasenwerte.

alfpCre- Tiere dienten als Kontrollen und werden im weiteren Verlauf als Wildtyp bezeichnet.

Der ME3738 induzierte Schutz im ConA Modell kann in diesem Stamm reproduziert werden. Im Gegensatz zu nicht therapierten Wildtyp Tieren sind die ME3738 therapierten Mäuse vor einer Erhöhung der Serumtransaminasenwerte geschützt. (Abb. 3.24 A/C roter Graph/schwarzer Graph).

Dagegen führt die ME3738 Therapie bei *alfpCre+/gp130loxP* Tieren zu keiner Protektion. Der Verlauf der Transaminasenwerte wird durch Me3738 Applikation in den hepatozytenspezifischen *gp130^{-/-}* Mäusen nicht verändert.

Ein massiver Leberschaden tritt bei diesen Tieren erst 24h nach Con A Injektion auf. Die Transaminasenwerte sind zu diesem Zeitpunkt deutlich höher als bei den Wildtyp Kontrollen.

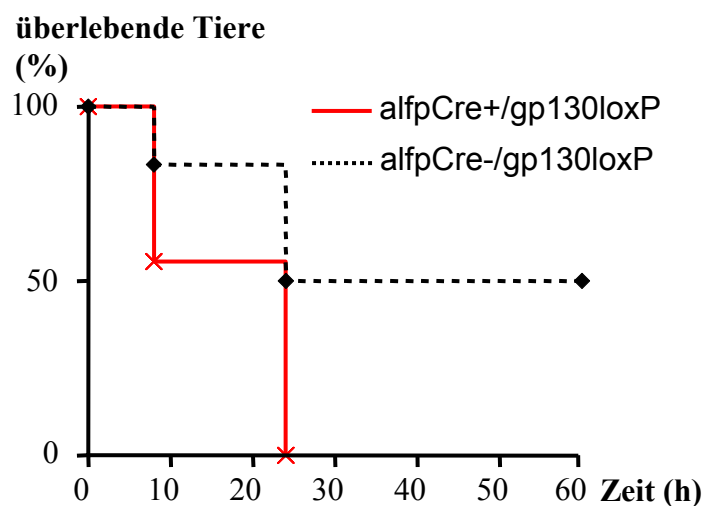


Abb. 3.25: Die Letalität ConA injizierter *alfpCre+/gp130loxP* Tiere im Vergleich zu Wildtyp Mäusen: Die Deletion des Rezeptors *gp130* in Hepatozyten führt zu einer verringerten Überlebensrate im Verlauf der ConA Hepatitis.

Es wurden 6 Wildtyp Tiere und 9 hepatozytenspezifische *gp130^{-/-}* Mäuse 20mg/kg ConA intravenös injiziert.

Wildtyp: 1 Tier starb nach 8 h, 2 weitere zwischen 8 h und kurz nach 24h. 3Tiere überlebten bis zum Ende des Beobachtungszeitraums.

Hepatozytenspezifische *gp130^{-/-}* Tiere: 4 Tiere starben vor 8h, die 5 anderen starben kurz vor oder direkt nach 24h.

Im Gegensatz zu Wildtyp Tieren, bei denen bereits nach 8h erhöhte Werte detektierbar sind, ist in den gp130^{-/-} Mäusen zu diesem Zeitpunkt eine nur leichte Erhöhung der Transaminasenaktivität zu beobachten (Abb. 3.24 A/C und Abb. 3.24 B/D).

Auffallend ist außerdem, dass alle in diesem Experiment eingesetzten hepatozytenspezifischen gp130 knockout Mäuse zwischen 24 h und 30 h starben. Die Tiere scheinen in der Spätphase der akuten ConA Hepatitis sensitiver zu reagieren.

3.4.2 Der Verlauf der ConA induzierten TNF Serumkonzentrationen ist bei gp130^{-/-} Mäusen unverändert.

Um die Frage zu klären ob möglicherweise stark erhöhte TNF Sekretion den Grund für die reduzierte Überlebensrate der hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäuse darstellt, wurden die TNF Serumwerte ConA injizierter Wildtyp- und transgener Mäuse ermittelt.

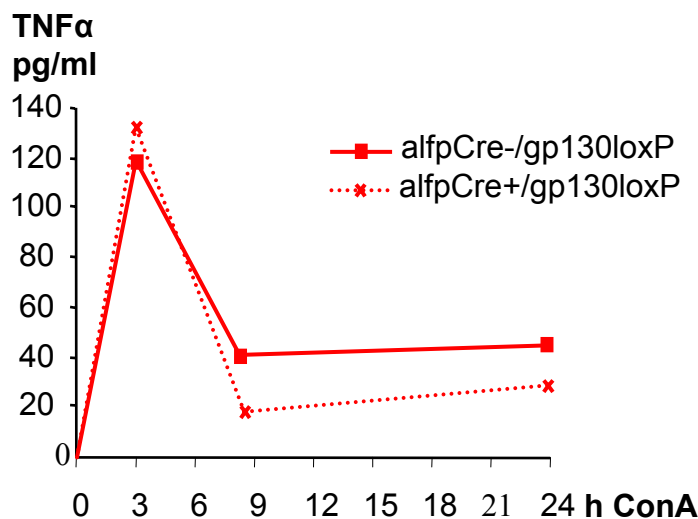


Abb. 3.26: TNF Konzentrationen im Serum ConA injizierter Wildtyp- (alfpCre-/gp130loxP) und hepatozytenspezifischer gp130^{-/-} Mäuse (alfpCre+/gp130loxP): Die Deletion des gp130 Allels in Hepatozyten hat keinen Einfluss auf die ConA induzierte Erhöhung der TNF Serumkonzentrationen.

Für die TNF Konzentrationsmessung wurden die Seren von 6-9 Tieren der jeweiligen Gruppe und des betreffenden Zeitpunkts zu gleichen Anteilen vereinigt und mittels ELISA analysiert.

Eine signifikante Erhöhung der TNF Konzentrationen bei *alfpCre+/gp130loxP* Tieren konnte nicht festgestellt werden (Abb. 3.26). Die Wirkung der ME3738 Therapie wurde bereits in BALB/C Tieren ermittelt. Des Weiteren bewirkt ME3738 in den hepatozytenspezifischen *gp130-/-* keine Protektion im Verlauf der ConA Hepatitis. Aus diesen Gründen wurden keine TNF Werte für ME3738 therapierte Tiere erhoben.

Die NFkB Aktivierung in der Leber hepatozytenspezifischer *gp130-/-* Mäuse nach ConA Injektion ist im Vergleich zu Wildtyp Mäusen verändert. Anhand des Beispiels der Nfkb Aktivierung 4 h nach ConA Injektion wird deutlich, dass auch in den hepatozytenspezifischen *gp130-/-* Tieren NFkB Aktivierung und dessen nukleäre Translokation induziert wird (Abb. 3.27). Allerdings ist in den hepatozytenspezifischen *gp130-/-* Mäusen das Verhältnis zwischen der p50 und p65 Untereinheit verschoben.

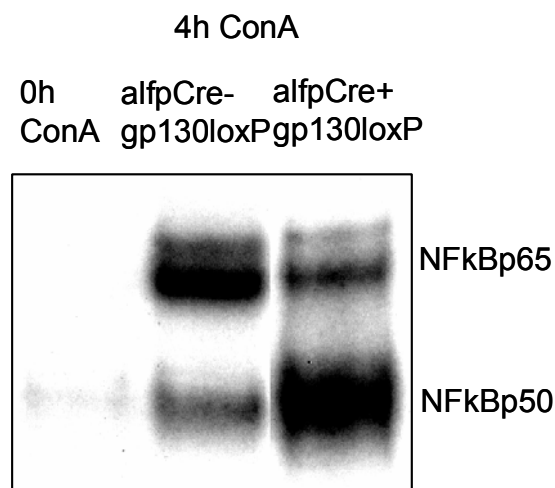


Abb. 3.27 NFkB Gel-Retentionsanalyse ConA injizierter Wildtyp- (*alfpCre-/gp130loxP*) und hepatozytenspezifischer *gp130-/-* Mäuse (*alfpCre+/gp130loxP*): NFkB wird in den hepatozytenspezifischen *gp130-/-* Mäusen induziert. Es kommt dabei in den transgenen Tieren zu einer stärkeren Aktivierung von p50 Untereinheiten. p65 wird dagegen weniger stark induziert

Jede Spur repräsentiert die Analyse der nukleären Proteinextrakte von 4 Tieren. Die Lebern mit 20mg/kg ConA injizierter Mäuse wurden zu gleichen Gewichtsanteilen vereinigt. Die nukleären Proteine wurden isoliert und auf Bindung eines radioaktiv markierten NFkB-Konsensus-DNA-Oligonukleotids untersucht. Zwischen 4-8h nach ConA Applikation liegt im Wildtyp das Maximum der Nfkb Aktivierung. Aus diesem Grund wurde der 4h Zeitpunkt für diese initiale Untersuchung verwendet. Der 0h Zeitpunkt repräsentiert sowohl *alfpCre-/gp130loxP* Tiere, als auch *alfpCre+/gp130loxP* Tiere.

In den *gp130-/-* Mäusen wird die p50-Untereinheit im Vergleich zur p65-Untereinheit anteilig stärker aktiviert. Die in weiteren Experimenten durchzuführende Vervollständigung der Zeitpunkte wird eine genauere Analyse zulassen.

3.4.3 Die ConA induzierte IL6 Sekretion ist in hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen erhöht.

Die ME3738 Behandlung von BALB/C Mäusen führt zu einer Reduktion der IL6 Serumkonzentrationen im Verlauf der ConA Hepatitis (Abb. 3.6). Die IL6 Konzentrationen nach ConA Injektion bei *alfpCre⁻/gp130loxP* Tieren verläuft identisch (Abb. 3.27 A). In nicht therapierten *alfpCre⁻/gp130loxP* Mäusen sind erhöhte IL6 Serumkonzentrationen bis zu 54h nach ConA Injektion messbar. Das Konzentrationsmaximum ist 8h nach Injektion des Lektins erreicht.

Wird der Leberschaden durch ME3738 Therapie inhibiert, fallen die im Vergleich zu nicht therapierten Tieren geringeren IL6 Werte nach 3h deutlich ab und erreichen zwischen 8 h und 24 h Normalwerte (Abb. 3.28 A).

Die Kinetik der IL6 Serumkonzentrationen bei *alfpCre⁺/gp130loxP* Mäusen nach ConA Injektion ist dagegen völlig verändert. In diesen Tieren bewirkt ME3738 Therapie keine Veränderung der Zytokinkonzentration gegenüber nicht behandelten Mäusen. Dieses Ergebnis korreliert mit dem ausbleibenden protektiven Effekt in Bezug auf den ConA induzierten Leberschaden.

Bei *alfpCre⁺/gp130loxP* Tieren steigen die IL6 Serumkonzentrationen nach ConA Injektion bis 24 h kontinuierlich an. Die Werte sind zu diesem Zeitpunkt deutlich höher als die Maximalwerte nicht therapierter Wildtyp Kontrollen (vergleiche Abb. 3.28 A roter Graph 8h mit Abb. 3.28 B roter/schwarzer Graph).

Zusätzlich ist der zeitliche Verlauf verändert. Kein Tier lebte wesentlich länger als 24 h nach der ConA Injektion. Entsprechend dem Zeitpunkt des stärksten Leberschadens 24 h nach ConA Injektion, erreichen die IL6 Konzentrationen als Ausdruck der eingeleiteten Abwehr die höchsten Werte.

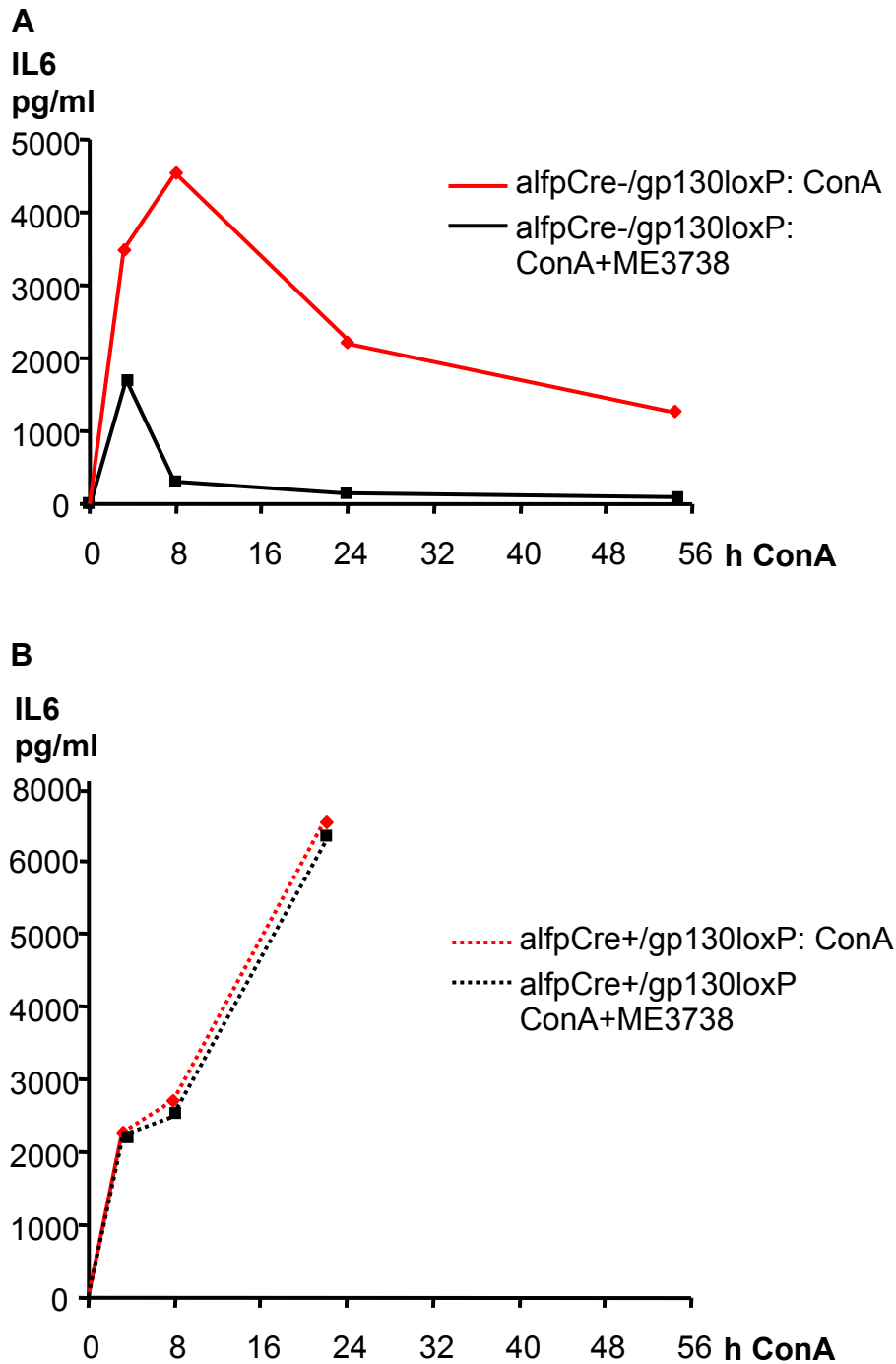


Abb. 3.28: Die IL6 Konzentrationen im Serum ConA injizierter Wildtyp- (alfpCre-/gp130loxP) und hepatozytenspezifischer gp130^{-/-} Mäuse (alfpCre+/gp130loxP), mit und ohne ME3738 Therapie:
 A) Wildtyp (alfpCre-/gp130loxP) Mäuse wurden mit 20mg/kg ConA injiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren retroorbital Blut entnommen. ME3738 therapierten Tiere wurden 14 h und 2 h vor der ConA Injektion 40mg/kg ME3738 subkutan injiziert. Die Seren der gleichbehandelten Mäuse wurden anteilsgleich vereinigt. Die IL6 Konzentrationen wurden mittels ELISA ermittelt.
 B) hepatozytenspezifische gp130^{-/-} Mäuse (alfpCre+/gp130loxP) wurden der Beschreibung unter A) entsprechend behandelt und auf IL6 im Serum untersucht.

3.4.4 In hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen ist im Verlauf der ConA Hepatitis keine hepatozelluläre STAT3 Aktivierung detektierbar.

In der Leber von Wildtyp Mäusen werden zwischen 2 h und 4 h nach ConA Injektion die Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT1 induziert (Abb. 3.8). Nicht bekannt ist, in welchem Zelltyp der Leber die STAT abhängigen Signalkaskaden aktiviert werden. Mit Hilfe hepatozytenspezifischer gp130^{-/-} Mäuse kann eine zelltypspezifische Differenzierung gp130 abhängiger Signalwege in der Leber vorgenommen werden.

ME3738 Therapie induziert keinen Schutz in diesen Tieren. Außerdem ist nach ME3738 Applikation keine Aktivierung der IL6-gp130/STAT3 abhängigen Signaltransduktion detektierbar (Abb. 3.18-3.21). Aus diesen Gründen wurde im Folgenden von der Untersuchung der ME3738 Effekte in diesem Mausstamm abgesehen.

Der Vergleich der STAT Aktivierung bei Wildtyp Tieren und hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen macht deutlich, dass die STAT3 Induktion nach ConA Applikation auf Hepatozyten beschränkt ist.

Bei hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen ist 4 h nach Initiierung der ConA Hepatitis in der Gel-Retentionsanalyse kein STAT3 Signal detektierbar (Abb. 3.29 A). Im Gegensatz dazu lässt sich in den Wildtyp Kontrolle STAT3 nachweisen.

Das STAT1 Signal hingegen ist in beiden Mausstämmen vorhanden (Abb. 3.29 B). Diese Ergebnisse legen nahe, dass STAT1 im Verlauf der ConA induzierten Hepatitis entweder in nicht-parenzymatischen Leberzellen oder über einen anderen Rezeptor, wie z. B. IFN-R (Interferon Rezeptor), in Hepatozyten aktiviert wird.

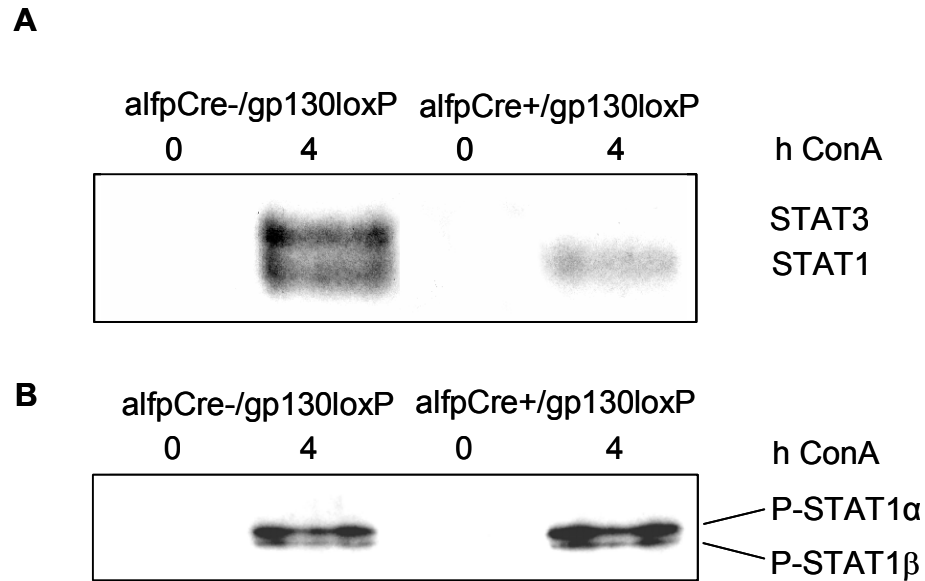


Abb. 3.29: Analyse der STAT Aktivierung in der Leber ConA injizierter Wildtyp bzw. hepatozytenspezifischer gp130^{-/-} Mäuse: ConA induziert in hepatozytenspezifische gp130^{-/-} Mäusen kein STAT3. Die STAT1 Aktivierung ist durch die gp130 Deletion nicht inhibiert.

A) STAT-Gel-Retentionsanalyse nukleärer Leberproteine. Jede Spur repräsentiert die Analyse der nukleären Proteinextrakte von 4 Tieren. Die Lebern von 20mg/kg ConA injizierter Mäuse wurden zu gleichen Teilen vereinigt. Die nukleären Proteine wurden isoliert und auf Bindung eines radioaktiv markierten STAT-Konsensus-DNA-Oligonukleotids analysiert. Die obere Bande entspricht STAT3, die untere STAT1 (siehe Abb. 3.8 B).

B) STAT1 Western Analyse der in A) beschriebenen Kernextrakte. Aktiviertes STAT1 wird durch einen P-STAT1 spezifischen Antikörper nachgewiesen.

3.4.5 Die SOCS3 mRNA Expression in der Leber von alfpCre+/gp130loxP Tieren ist im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert.

Möglicherweise wird die ConA Induzierte IL6 Sekretion in Form einer gp130 abhängigen negativen Rückkopplung reguliert. So könnte eine fehlende STAT3 Aktivität inhibitorisch wirkende Komponenten des gp130 Signalweges beeinflussen. Die Familie der SOCS Proteine gehören zu einer Gruppe inhibitorisch agierender Proteine. Sie reduzieren die katalytische Aktivität der Januskinasen⁴³.

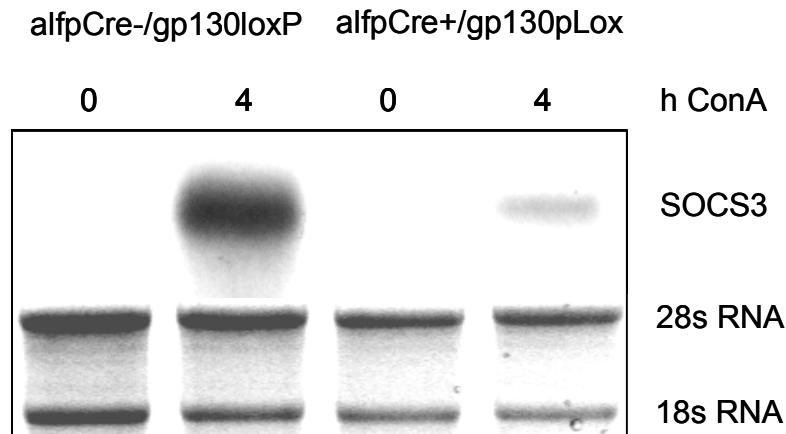


Abb. 3.30: SOCS3 Northern Analyse ConA injizierter Wildtyp bzw. hepatozytenspezifischer gp130^{-/-} Mäuse (alfpCre+/gp130loxP): Die ConA induzierte SOCS3 Transkription ist in hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen reduziert.

Northern-Blot Analyse der RNA ConA stimulierter Mäuse: Pro Zeitpunkt wurde die isolierte RNA von 4 Tieren zu gleichen Teilen gemischt, im denaturierenden Agarose Gel aufgetrennt und mit einem radioaktiv markierten, zur SOCS3-cDNA Sequenz komplementären DNA Fragment, hybridisiert. Die Abbildung der im Agarose Gel aufgetrennten 28s und 18s RNA, dient als Kontrolle das gleiche Mengen RNA aufgetrennt wurden.

4 h nach ConA Applikation sind in Wildtyp Tieren SOCS3 mRNA Transkripte nachweisbar. In der Leber hepatozytenspezifischer gp130^{-/-} Mäuse wird die SOCS3 mRNA Expression ebenfalls initiiert. Die Menge der SOCS3 Transkripte ist allerdings deutlich geringer (Abb. 3.30).

3.4.6 Hepatozytenspezifische gp130^{-/-} Tiere exprimieren im Verlauf der ConA Hepatitis kein SAA2.

Um die Folgen der hepatozytenspezifischen gp130 Deletion für die Induktion der Akut Phase Reaktion zu untersuchen wurden die Konzentrationen des Proteins SAA2 im Verlauf der ConA Hepatitis ermittelt.

Wildtyp Tiere sezernierten SAA2 schon 3 h nach ConA Injektion in großen Mengen ins Blut. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums 54 h nach Initiierung der Hepatitis bleiben die SAA2 Konzentrationen stark erhöht (Abb. 3.31 roter Graph).

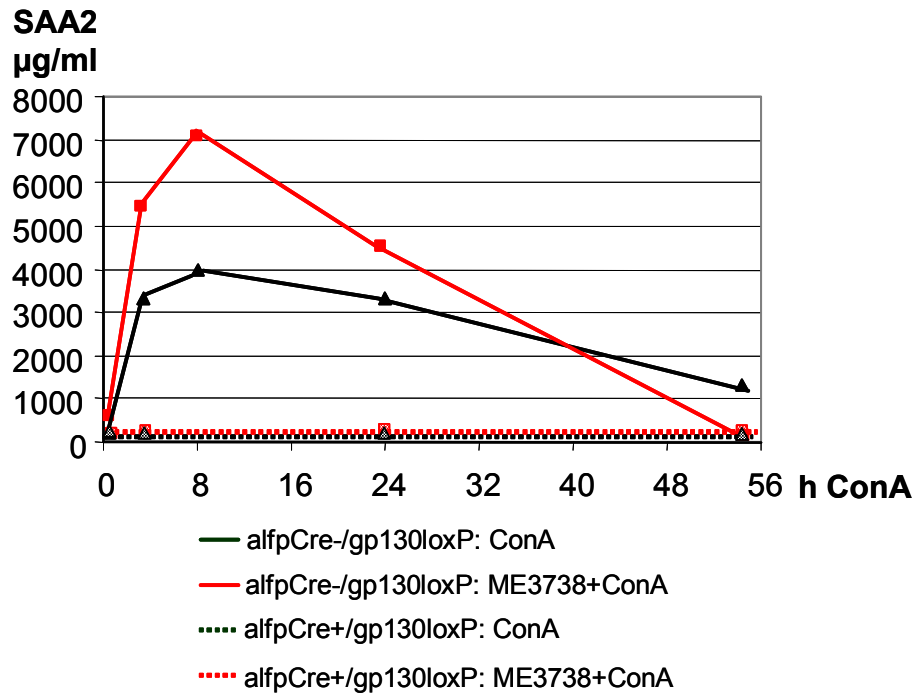


Abb. 3.31: Analyse der SAA2 Proteinkonzentration im Serum ConA bzw. ME3738+ConA injizierter Wildtyp (alfpCre-/gp130loxP) und hepatozytenspezifischer gp130^{-/-} Mäuse (alfpCre+/gp130loxP): Hepatozytenspezifische gp130^{-/-} Mäuse exprimieren kein SAA2 im Verlauf der ConA Hepatitis. ME3738 Therapie verändert die SAA2 Expression im Verlauf der ConA Hepatitis.

SAA ELISA: Die Seren der Tiere jeder Gruppe und des betreffenden Zeitpunkts wurden zu gleichen Teilen gemischt und auf die Konzentrationen von SAA Protein mittels ELISA untersucht.

ME3738 Therapie verändert den Verlauf. SAA2 ist schon bei der Injektion des Lektins im Blut nachweisbar. Die Konzentrationen sind verglichen mit nicht therapierten Wildtyp (alfpCre-/gp130loxP) Mäusen erhöht, erreichen aber früher wieder das Ausgangsniveau (Abb. 3.31 schwarzer Graph).

Hepatozytenspezifische gp130^{-/-} Tiere (alfpCre+/gp130loxP) sind dagegen nicht in der Lage SAA2 zu synthetisieren. Das Protein ist weder bei therapierten noch bei unbehandelten Mäusen detektierbar. Die Akut Phase Reaktion bleibt aus (Abb. 3.31 roter/schwarzer gestrichelter Graph).

ME3738 Therapie führt bei Wildtyp Mäusen zu einer gp130 abhängigen Leberprotektion. Das zeigen die ausbleibenden Protektionseffekte in den beiden knockout Mausstämmen.

3.5 IL6 Präinjektion schützt IL6^{-/-} Mäuse vor ConA induzierten Leberschaden; bei hepatozytenspezifische gp130^{-/-} Mäusen hat IL6 keinen Einfluss auf den Untergang von Hepatozyten.

Um den Nachweis zu führen, dass IL6 der Faktor ist, der in Wildtyp Tieren die Leberprotektion verursacht, wurden IL6^{-/-} und hepatozytenspezifische gp130^{-/-} Mäuse vor der ConA Injektion mit rekombinanten humanen IL6 behandelt. In Wildtyp Mäuse führt eine IL6 Injektion zu einem Schutz vor der Ausbildung der ConA Hepatitis¹⁸.

IL6^{-/-} Tiere sind durch die Vorbehandlung mit rekombinanten IL6 vor der Ausbildung eines Leberschadens geschützt (Abb. 3.32 C/D). Die Aktivität der Serumtransaminasen GOT bzw. GPT wird durch IL6 deutlich reduziert (Abb. 3.32 C/D schwarzer Graph). Unbehandelte Tiere entwickeln nach der Injektion des Lektins einen massiven Leberschaden (Abb. 3.32 C/D roter Graph).

Der IL6 abhängige Protektionseffekt bleibt in hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Tieren aus. Die Injektion des Zytokins hat keine Veränderung der Aktivität der Serumtransaminasen zur Folge (Abb. 3.31 A/B). Der Verlauf der Transaminasenwerte ist äquivalent zu den Experimenten mit ME3738 Vorbehandlung (siehe Abb. 3.24 C/D).

Auch die Sterblichkeit der Mäuse wird durch IL6, wie durch ME3738 nicht beeinflusst. Die IL6 Injizierten *alfpCre+/gp130loxP* Tiere starben zwischen 24 h und 36 h nach Initiierung der Hepatitis (siehe auch Abb. 3.25).

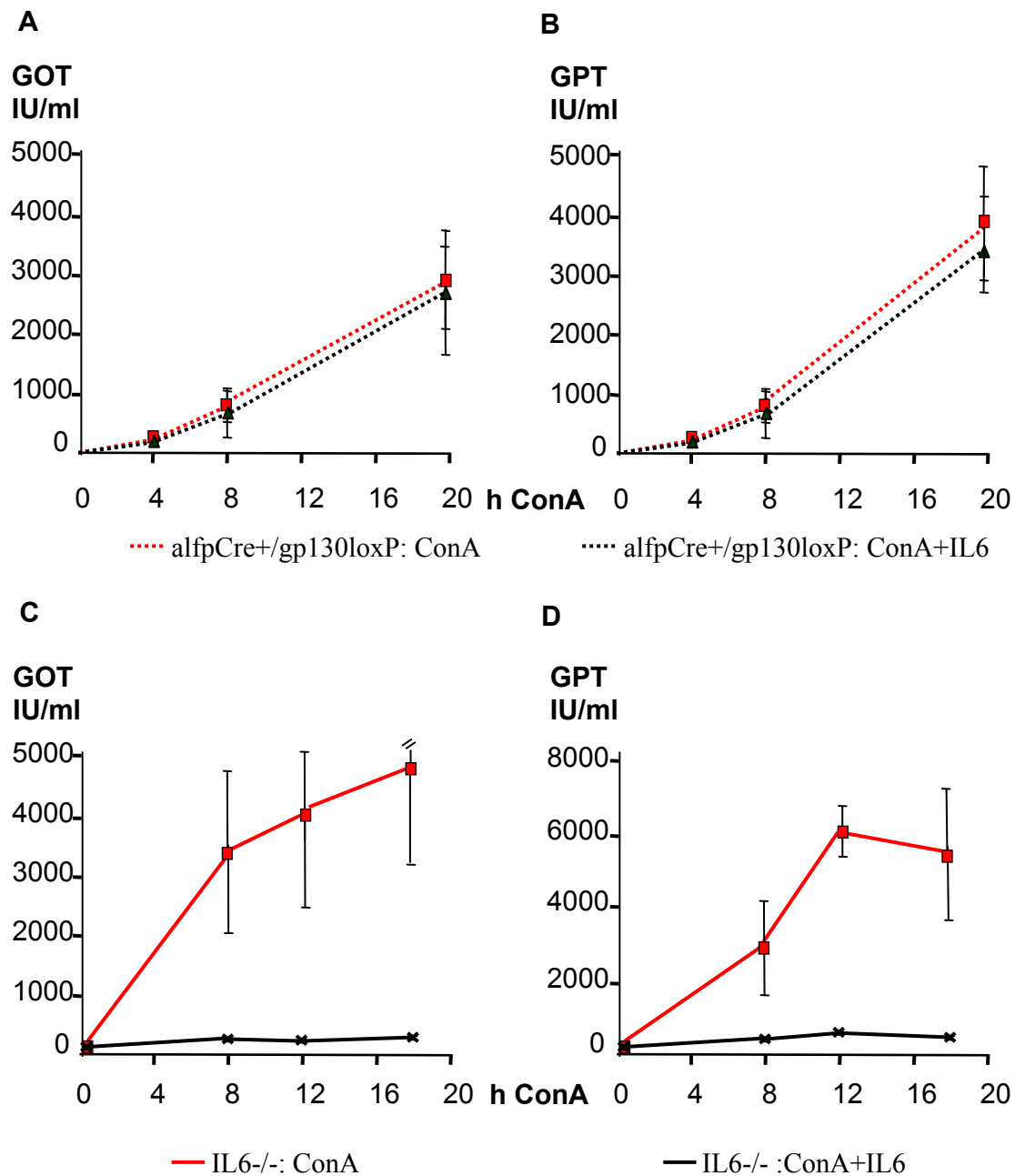


Abb 3.32: Die Effekte der IL6 Behandlung auf die Aktivität der Serumtransaminasen GOT und GPT im Verlauf der ConA Hepatitis bei hepatozytenspezifische gp130^{-/-} Mäusen (alfpCre+/gp130loxP) und in IL6^{-/-} Tieren (C/D): IL6 Injektion führt bei IL6^{-/-} Mäusen zu einem Ausbleiben der ConA Hepatitis. Bei hepatozytenspezifische gp130^{-/-} Mäusen ist kein Protektionseffekt zu beobachten.

A/B: Allen Tiere wurde 20mg/kg ConA intravenös injiziert. Den IL6 behandelten Tieren wurde 10µg rekombinantes humanes IL6 intraperitoneal 3 h vor der ConA Applikation injiziert

Pro Zeitpunkt und Gruppe wurden 4-6 Mäuse in die Erhebung der Messergebnisse einbezogen. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren retroorbital Blut entnommen, und das Serum auf GOT (A) bzw. GPT (B) Aktivität untersucht.

C/D: Allen Tiere wurde 25mg/kg ConA intravenös injiziert. Den IL6 behandelten Tiere wurde 10µg rekombinantes humanes IL6 intraperitoneal 3 h vor der ConA Applikation injiziert

Pro Zeitpunkt und Gruppe wurden 4 Mäuse in die Erhebung der Messergebnisse einbezogen. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren retroorbital Blut entnommen und das Serum auf GOT (C) bzw. GPT (D) Aktivität untersucht.

4 DISKUSSION:

4.1 ME3738 ist ein hepatoprotektiv wirksames Sapogenin:

Die Entwicklung leberprotektiver Substanzen, ist ein wichtiges Ziel aktueller Forschungsprojekte. Behandlungsstrategien, die zur Reduktion der im Rahmen vieler Leberschädigungen auftretenden nekrotischen Zelluntergänge führen, könnten insbesondere bei der Therapie der chronischen Hepatitis B und –C zum Einsatz kommen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Behandlungsstrategien untersucht, die zu einer Reduktion der Leberschäden im Verlauf der ConA induzierten Hepatitis führen. Bei diesem Tiermodell wird durch die Injektion des Lektins Concanavalin-A eine immunvermittelte Leberschädigung induziert. Die mit der Hepatitis einhergehende und mit humanen Lebererkrankungen vergleichbare Veränderung des Zytokinmilieus, machen die ConA Hepatitis zu einem geeigneten Modell für die Untersuchung neuartiger hepatoprotektiver Substanzen.

Sapogenine gehören zu der Substanzgruppe der triterpenen Glucuronididen. Diese Pflanzeninhaltsstoffe werden von verschiedenen Pflanzenarten synthetisiert. Das Sapogenin Soyaspogenol-A wirkt im ConA Modell hepatoprotektiv. Dagegen kann durch die Substanz der Verlauf einer chronischen CCL4 Schädigung der Leber nicht beeinflusst werden (Meiji Investigator Brochure 2001) ¹²⁷. Die Wirksamkeit von Sapogeninen bezüglich ihres leberschützenden Effekts ist abhängig von der Struktur der Substanz. So reduziert z. B. das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe am C30 des Triterpens den hepatoprotektiven Charakter ⁷⁶.

ME3738 ist ein Derivat von Soyaspogenol A. Die C22 Hydroxylgruppe des Sapogenol-A ist bei ME3738 durch eine Carbonylgruppe substituiert (siehe Abb. 1.2).

Im Gegensatz zu Soyaspogenol-A bewirkt ME3738 im chronischen CCL4 Intoxikationsmodell einen Schutz der Leber (Meiji Investigator Brochure 2001) ¹²⁷. Im Rahmen dieser Dissertation wurde diese Substanz auf ihre Wirksamkeit im Modell der ConA induzierten Hepatitis untersucht.

Ziel war es die molekularen Mechanismen der ME3738 induzierten Leberprotektion zu analysieren.

4.2 ME3738 induziert einen Anstieg der IL6 Konzentrationen im Serum behandelte Mäuse:

Die subkutane Injektion von ME3738 führt zu einem Anstieg der IL6 Konzentrationen im Serum behandelte Mäuse. Bereits 2 h nach Applikation ist das Maximum der Zytokin-Konzentration im Serum nachweisbar (Abb. 3.10).

Weder in der Leber noch in der Milz ist nach ME3738 Stimulation eine erhöhte IL6 mRNA Expression nachweisbar (Abb. 3.13). Zusätzliche Untersuchungen zeigen, dass auch lymphoide Organe nicht der Ursprung einer vermehrten IL6 mRNA Synthese sind (nicht abgebildete Daten).

Real-time-PCR Analysen der Firma Meiji stützen diese Ergebnisse. Verschiedene Organe wurden auf die Expression von IL6 mRNA untersucht. In keinem der untersuchten Gewebe war das Zytokin detektierbar (persönliche Mitteilung Fa. Meiji).

Erst eine umfangreichere Analyse aller potentiell IL6 exprimierender Gewebe, dürfte letztlich Klarheit darüber geben, ob die ME3738 Therapie die Stimulation der IL6 mRNA Synthese bewirkt und so zu erhöhten IL6 Serumkonzentrationen führt.

Die Kinetik des IL6 Verlaufs macht aber eine posttranskriptionelle Regulation wahrscheinlicher. So könnten in spezifischen Zellpopulationen Zytokinreservoirs existieren, die nach Stimulation eine schnelle und massive Freisetzung von Zytokinen ermöglichen.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass in Bereichen der extrazellulären Matrix oder anderen interzellulären Räumen immunmodulatorisch wirksame Proteine gebunden sind. Durch die Interaktion mit spezifischen Liganden könnte eine Freisetzung der Proteine erfolgen und zu einem Anstieg der Proteinkonzentration im Serum führen⁷⁷.

So wird z. B. basic-fibroblast-growth-factor (bFGF) durch Interaktion mit Heparansulfatgruppen in der extrazellulären Matrix immobilisiert. Steigt die Thrombinkonzentration in den Bereichen der subendothelialen extrazellulären Matrix, kommt es zu einer proteolytisch induzierten Dissoziation von bFGF^{78,79}. Für die Wachstumsfaktoren GM-CSF und IL3 sind ähnliche Mechanismen nachgewiesen worden^{80,81}.

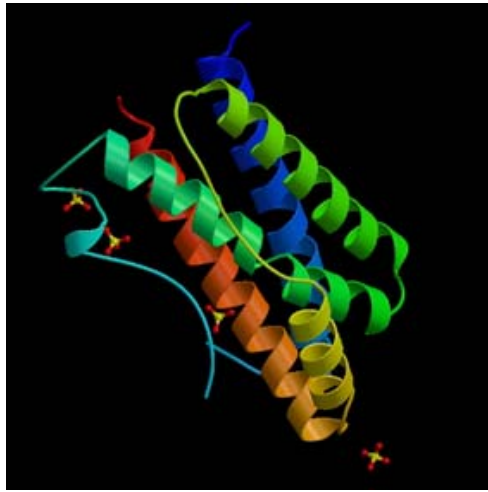


Abb. 4.1: Die Tertiärstruktur von humanen Interleukin-6:

Die kompakte Molekülstruktur ist gekennzeichnet durch 4 alpha-Helices. Die Helices verlaufen antiparallell und werden über Disulfidbrücken stabilisiert. Die vierte Helix (hier von grün in blau übergehend) ist verantwortlich für die biologische Funktion des Zytokins⁸².

GM-CSF und IL6 sind trotz sehr differierender Aminosäuresequenzen in ihrer Struktur sehr ähnlich (Abb. 4.1)⁸². Es ist nicht auszuschließen, dass im Organismus IL6 Reservoirs in Bereichen der extrazellulären Matrix existieren, die ähnlich der beschriebenen Mechanismen von GM-CSF oder bFGF freigesetzt werden.

Interessant sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen die zeigen, dass IL6 im Serum in verschiedenen Formen gebunden vorliegen kann.

Ist IL6 mit löslichem gp80 Rezeptor (s-gp80) komplexiert, wirkt es stimulatorisch⁸³. Dagegen ist die Wirkung von IL6 im Verbund eines trimeren Komplexes bestehend aus IL6, löslichem gp80 und löslichem gp130 (s-gp130) inhibitorischer Natur⁸⁴. Ein Reservoir biologisch inaktivierten IL6 wäre somit durch die Verteilung über den Blutkreislauf ubiquitär vorhanden. ME3738 könnte zu einer Freisetzung von IL6 aus dem inhibitorisch wirksamen Komplex führen und den Anteil stimulatorisch wirksamen IL6 erhöhen.

IL6 induziert u. a. die Transkription von Akut-Phase-Reaktion-Genen in der Leber^{56,57,58}. Diese antiinfektiöse Reaktion ist eine akute und unspezifische Antwort auf Störungen des Organismus⁵⁸.

Eine schnelle, durch die Freisetzung existierender Zytokinreservoirs verursachte IL6 Konzentrationserhöhung im Serum könnte ein probates System darstellen, um schnell auf pathophysiologische Reize zu reagieren.

ME3738 könnte im Sinne eines „*Mimikry*“ physiologischer Signale die Auflösung und Freisetzung der gespeicherten Zytokinreserven induzieren.

4.3 Durch ME3738 werden in Hepatozyten gp130 vermittelt STAT3 abhängige Signalwege aktiviert:

Die durch ME3738 induzierte Erhöhung der IL6 Konzentrationen führt zu der hepatozellulären Aktivierung von STAT3 (Abb. 3.11 und 3.18).

ME3738 Stimulationsexperimente bei IL6^{-/-} Mäusen zeigen, dass IL6 für die STAT3 Induktion essentiell ist. In diesen Tieren konnte im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen keine Aktivierung von STAT3 nachgewiesen werden (vergleiche Abb. 3.11 mit 3.19). ME3738 Therapie bewirkt somit die hepatische STAT3 Aktivierung ausschließlich durch die Freisetzung von IL6. Andere STAT3 aktivierende Mediatoren sind nicht beteiligt.

Die Analyse hepatozytenspezifischer gp130^{-/-} Mäusen verdeutlicht, dass dieser Effekt auf Hepatozyten beschränkt ist. Fehlt der Rezeptor gp130 in dieser Zellpopulation, ist die ME3738/IL6 vermittelte STAT3 Translokation nicht nachweisbar (Abb.3.18).

Neben STAT3 wird durch ME3738 der Transkriptionsfaktor STAT1 aktiviert (Abb. 3.18). Dieser Effekt ist IL6 abhängig. In IL6^{-/-} Tieren ist keine STAT1 Aktivierung zu beobachten (Abb. 3.19). In hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen ist dagegen die ME3738 vermittelte STAT1 Induktion weiterhin detektierbar.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die ME3738 vermittelte STAT1 Aktivierung ausschließlich in nicht hepatozytären Zellen induziert wird.

Dass die STAT Aktivierung IL6 vermittelt ist, kann durch Behandlung von hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäuse mit rekombinanten IL6 gezeigt werden. Durch IL6 Injektion induziert man ein identisches Muster der STAT Aktivierung (Streetz et al., 2002 submittet). STAT1 wird in diesen Tieren weiterhin aktiviert. Das STAT3 Signal ist nicht mehr vorhanden.

Durch die Analyse der leberspezifischen STAT3 Aktivierung bei Wildtyp, IL6^{-/-} und hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen konnte die IL6 Abhängigkeit der ME3738

induzierten STAT3 Aktivierung nachgewiesen werden. Die hepatozytäre Expression des Rezeptors gp130 ist dabei essentiell für die intrazelluläre Aktivierung und Translokation von STAT3.

Sowohl IL6^{-/-} Mäuse, als auch hepatozytenspezifische gp130^{-/-} Mäuse sprechen im Rahmen der Con A Hepatitis im Gegensatz zu Wildtyp Tieren nicht auf die ME3738 Therapie an (Abb.3.22 und 3.23). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die durch ME3738 aktivierten IL6/gp130 abhängigen Signalwege Leberprotektion vermitteln. Unklar bleibt, welche intrazellulären Mediatoren den Leberzellschutz vermitteln.

4.4 ME3738 induziert in Hepatozyten IL6/gp130 abhängig die Expression von Akut-Phase-Genen:

Eine physiologische Funktion des proinflammatorischen Zytokins IL6 ist die Induktion der Akut-Phase-Reaktion-Genexpression in der Leber^{53,54}.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die ME3738 abhängige Transkription der Akut-Phase Gene SAA2 und Hemopexin untersucht. Die Transkription beider Gene wird durch ME3738 Therapie aktiviert. Die Aktivierung ist abhängig von IL6 und der Expression des Rezeptor gp130 in Hepatozyten (Abb. 3.20).

Sowohl das Fehlen von IL6 als auch die Deletion des Rezeptors gp130 in Hepatozyten resultiert in einem Ausbleiben der ME3738 induzierten Aktivierung der Transkription von SAA und Hemopexin. Die fehlende Transkription von SAA2 in IL6 und hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Tieren hat zur Folge, dass der ME3738 abhängige Anstieg der SAA Serumkonzentrationen ausbleibt (Abb. 3.21). Eine singuläre Injektion von ME3738 führt dagegen in Wildtyp Mäusen zu einer massiven, ca. 100 fachen Erhöhung der SAA Konzentration im Serum (Abb. 3.21). Der zeitliche Verlauf korreliert mit der Kinetik der ME3738 induzierten IL6 und STAT3 Induktion (siehe Abb. 3.21 und 3.10-3.12).

Das vollständige Ausbleiben der ME3738 induzierten SAA Expression in IL6^{-/-} Mäusen ist in Bezug auf die Spezifität der ME3738 induzierten Protektionsmechanismen interessant. Die Transkription des SAA2 Gens wird neben IL6 u. a. durch IL1, und TNF aktiviert^{85,86,87,88,89,90}. Im Fall der ME3738 Therapie ist die Deletion des IL6 Gens ausreichend, um die SAA Transkription zu inhibieren.

Eine mit ME3738 Injektion einhergehende zusätzliche Sekretion von IL1 oder TNF scheint also nicht vorzuliegen.

Die Untersuchungen an IL6^{-/-} und gp130^{-/-} Tieren deuten somit darauf hin, dass der ME3738 vermittelte Schutz im ConA Modell vornehmlich durch die Induktion IL6/gp130 abhängiger Signalwege in Hepatozyten vermittelt wird. Durch den IL6/gp130 Signalweg wird eine Vielzahl von Genen aktiviert, die für die Vermittlung des ME3738 abhängigen Schutzes verantwortlich sein könnten. Im Folgenden sollen vor allem die mögliche Rolle von SAA2 und die Funktion IL6 abhängig regulierter anti-apoptischer Gene diskutiert werden.

4.4.1 Welchen Protektionsmechanismus könnte SAA vermitteln?

Die Rolle des Proteins SAA2 in der Akut Phase Reaktion sind bis dato nicht eindeutig geklärt. Insbesondere aber die Interaktion von SAA mit Metalloproteinasen könnte für eine Protektion der Leber von Bedeutung sein.

SAA ist ein potentiell Substrat für verschiedenen Metalloproteinasen (MMP's). So degradieren MMP1, MMP2 und MMP3, SAA durch proteolytische Spaltung⁹¹.

MMP's sind Zink und Cadmium abhängige Proteinasen, die in interzelluläre Bereiche sezerniert werden und dort Proteine der extrazellulären Matrix degradieren. In der Embryonalentwicklung, dem Wachstum von Geweben, aber auch der Geweberemodellierung und – Wiederherstellung, kommen dieser Proteinfamilie essentielle Aufgaben zu^{92,93,94,95}.

Zusätzlich sind pathologische Gewebeveränderungen mit einer disregulierten Expression und Sezernierung von MMP's assoziiert^{96,97}. In der TNF induzierten Hepatitis führt die Applikation von MMP-Inhibitoren zu einem Schutz der Leber⁹⁸. Die TNF induzierte MMP Expression von MMP-2, MMP-3 und MMP-9 scheint für die pathologische Infiltration von Leukozyten essentiell zu sein⁹⁸.

Con A induziert in humanen hepatischen Stellat-Zellen eine erhöhte MMP-2 Expression⁹⁹. Es ist denkbar, dass SAA als Substratkonkurrenz zu Bestandteilen der extrazellulären Matrix agiert, die im Rahmen der TNF vermittelten Hepatitis durch MMP's degradiert werden.

Eine massive Konzentrationserhöhung von SAA im Serum würde inhibitorisch auf MMP-2 wirken. Dieser Mechanismus könnte einen Erklärungsansatz darstellen, wa-

rum die Sekretion von SAA, mittels Zytokin abhängiger Signalkaskaden massiv gesteigert wird. Eine effektive Substratkompetition ist ausschließlich bei einem drastischen Anstieg der Konzentration des potentiellen Kompetitors SAA's zu erwarten.

Dabei spricht die im Rahmen der ME3738 Therapie weiterhin detektierbare Rekrutierung von mononukleären Zellen in den sinusoidalen Bereichen nur scheinbar gegen die Möglichkeit, dass die ME3738 vermittelte Leberprotektion durch SAA vermittelt wird.

Es ist nicht zu erwarten, dass die ConA vermittelte Interaktion von Immunzellen mit den hepatischen Sinusoiden durch SAA beeinflusst wird. Die Migration von mononukleären Zellen weit in die Hepatozytenfelder, ist in ME3738 behandelten Mäusen deutlich weniger ausgeprägt als in den nicht therapierten Tieren (vergleiche Abb. 3.4 B mit E).

Die ME3738 induzierte massive Expression von SAA könnte somit einen Teil des Mechanismus darstellen, der zu der ME3738 induzierten Protektion im Verlauf der ConA Hepatitis führt.

4.4.2 IL6 aktiviert in Hepatozyten anti-apoptotische Signalwege:

Neben der Induktion der Akut-Phase Genexpression könnte IL6 über die Aktivierung anti-apoptotischer Gene zellprotektiv wirksam werden. IL6 induziert hepatoprotektive Signalwege in Hepatozyten²⁴. In den Lebern von CCL4 behandelten IL6-/- Mäusen kommt es gehäuft zu Apoptosen und Nekrosen von Hepatozyten²⁴.

CCL4 wirkt als Hepatotoxin durch eine Permeabilisierung zellulärer und mitochondrialer Membranen. Zusätzlich stellen die bei der Metabolisierung von CCL4 entstehenden freien Radikale eine Ursache für die Entstehung des Leberschadens dar¹⁰⁰.

Möglicherweise ist die verringerte Expression anti-apoptotischer Proteine, wie Bcl-2 oder Bcl-XL in der Leber von IL6-/- Mäusen der Grund für die Sensitivierung gegenüber des CCL4 induzierten Leberschadens²⁴. Bei IL6-/- Mäusen kommt es im Zuge Apoptose induzierender Prozesse in Hepatozyten zu einer beschleunigten Degradation anti-apoptotischer Faktoren. Dieses Ergebnis stützt die These, dass IL6 in der Leber anti-apoptotisch wirksam wird.

ME3738 könnte daher IL6 abhängig die Expression anti-apoptotischer Faktoren induzieren und somit den Schutz im ConA Modell vermitteln.

Der Vergleich der Experimente ME3738 therapierter Wildtyp-, IL6-/- und hepatozytenspezifischer gp130 -/- Mäuse im Verlauf der ConA Hepatitis zeigt, dass der IL6-gp130 Signalweg die Leberprotektion induziert. Im Gegensatz zu Wildtyp Tieren ist durch ME3738 Therapie in den genetisch veränderten Mausstämmen keine hepato-protective Wirkung nachweisbar.

Es ist daher davon auszugehen, dass der ME3738 vermittelte Schutz auf Ebene der Hepatozyten wirksam wird. Dafür sprechen die Ergebnisse der hepatozytenspezifischen gp130-/- Tiere und, dass der ME3738 vermittelte Schutz in unterschiedlichen experimentellen Leberschädigungsmodellen nachweisbar ist.

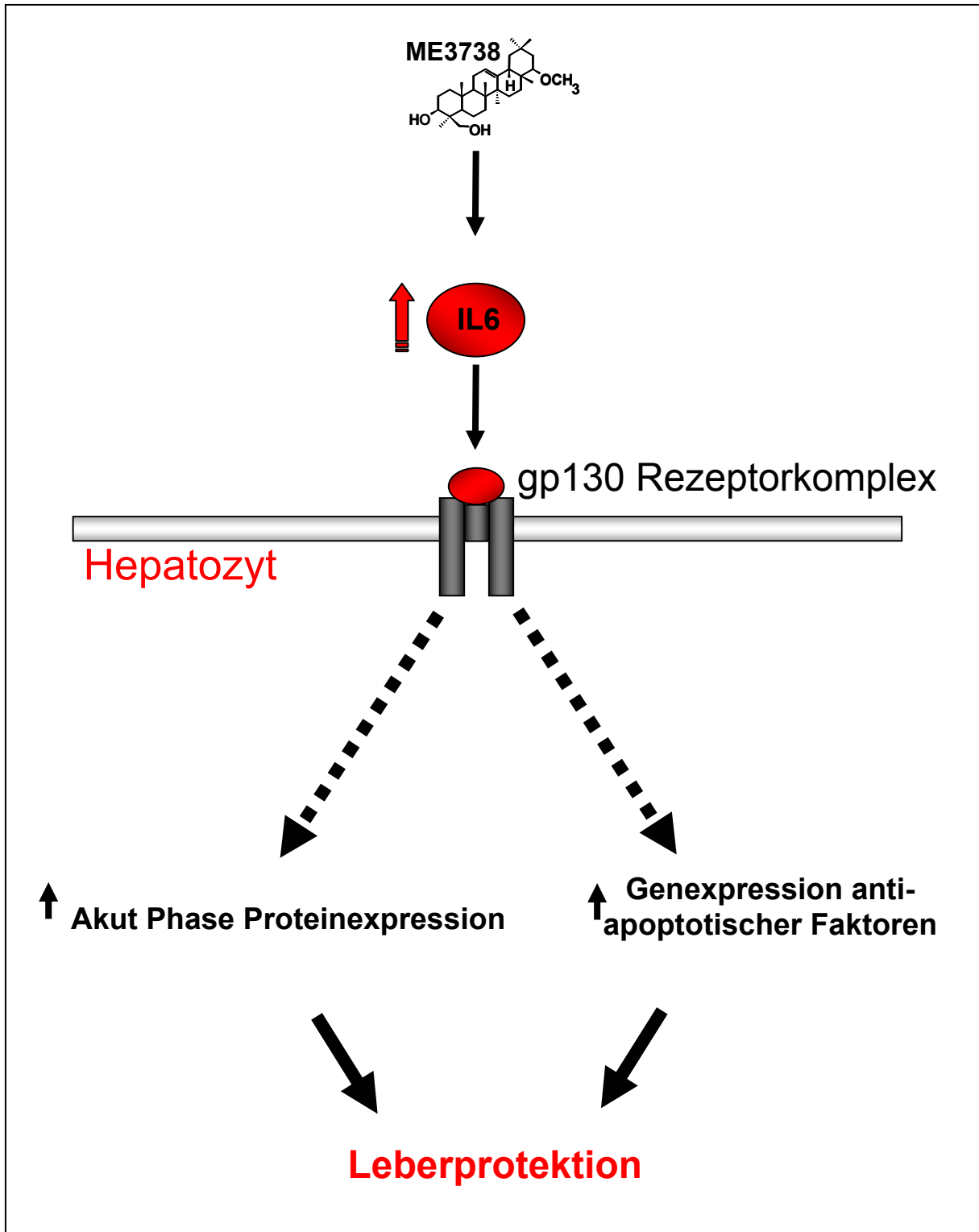


Abb. 4.2: Modell der molekularen Mechanismen, die zum ME3738 vermittelten Schutz der Leber im Verlauf der ConA vermittelten Hepatitis führen könnten:

ME3738 induziert einen Anstieg der IL6 Konzentrationen im Serum behandelter Tiere. In Hepatozyten werden IL6 / gp130 abhängig hepatoprotektive Signalwege aktiviert. Die erhöhte Expression von Akut Phase Proteinen wie SAA2 und die Expression anti-apoptischer Gene könnten den ME3738 abhängigen Leberschutz vermitteln.

4.5 Wildtyp Mäuse sind durch die ME3738 Therapie vor der Ausprägung der ConA Hepatitis geschützt:

ME3738 Injektion verhindert die Bildung nekrotischer Bereiche in der Leber und senkt dadurch den ConA induzierten Anstieg der Aktivität der Transaminasen GOT und GPT im Serum (Abb. 3.2 und 3.3).

Die Infiltration aktivierter mononukleärer Zellen wird durch ME3738 nicht inhibiert (Abb. 3.4). Ob eine quantitative Modulation der Infiltration stattfindet kann anhand der durchgeführten Analysen nicht sicher beantwortet werden. ME3738 scheint keinen Einfluss auf die ConA vermittelte Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen im Bereich der Lebersinusoiden auszuüben.

Nicht geklärt bleibt, aus welchem Grund nur ca. 80% der ME3738 behandelten Tiere vor der ConA Hepatitis geschützt sind. Eine Erklärung könnte in der Herstellung der injizierbaren Form der ME3738 Lösung liegen. Die Substanz ist in nicht toxischen Lösungsmitteln schlecht löslich. Die injizierte CMC/ME3738 Lösung hat einen suspensionsartigen Charakter. Es ist wahrscheinlich, dass nicht in jedem Fall identische Mengen des Therapeutikums aufgenommen werden. Bestätigt wird das durch Messungen der Konzentrationen der Substanz nach ME3738 Behandlung. Proben von Seren und Lebergewebe ME3738 behandelter Mäuse wurden durch die Firma Meiji auf die Konzentrationen der Substanz untersucht. Es wurden deutliche Unterschiede in der resorbierten Menge der Substanz festgestellt. Eine Weiterentwicklung von ME3738 in Bezug auf das Löslichkeits- und Resorptionsvermögen ist ein wichtiger Schwerpunkt der aktuellen Forschungen der Firma Meiji. Nicht zuletzt im Rahmen der aktuell stattfindenden „Phase-1“ Studie in Japan werden die Fortschritte dieser Entwicklungsstrategien zu ermitteln sein.

4.5.1 ME3738 Therapie reduziert die TNF Serumkonzentration im Verlauf der ConA Hepatitis:

Bei der Pathogenese humaner Lebererkrankungen ist eine Korrelation von erhöhten TNF Serumkonzentrationen mit der Schwere der Erkrankung nachgewiesen. So induzieren HBV und HCV die Expression von TNF in der Leber und humanen Hepatomzelllinien⁹.

Die Zytokine TNF und IFN γ vermitteln auch im ConA Modell der experimentellen Hepatitis die leberschädigenden Prozesse²¹. Die Applikation von spezifischen Antikörpern gegen TNF oder IFN γ inhibieren die Ausprägung des Leberzellschadens^{19,25}.

Die Therapie mit ME3738 reduziert die Serumkonzentration beider Zytokine (siehe Abb. 3.5/ bzw. Meiji Investigator Brochure, 2001)¹²⁷. Dieser Effekt könnte einen weiteren Erklärungsansatz des therapeutischen Potentials von Me3738 darstellen.

Me3738 Behandlung inhibiert den Anstieg der Aktivität der Serumtransaminasen nahezu vollständig. Die TNF Konzentrationen sind dabei nur um ca. 40% reduziert. Geht man von einer direkten Korrelation der TNF Konzentrationen mit dem Ausmaß der Leberschädigung aus, so kann die ME3738 induzierte Reduktion nicht der alleinige Grund für die Inhibition der ConA Hepatitis sein. Möglicherweise ist die Verringerung der TNF Werte ein Sekundäreffekt des ME3738 vermittelten Schutzes. Im Verlauf der Therapie induzierte Signale könnten zu einer reduzierten Makrophagenaktivierung und deren Zytokinsekretion beitragen.

Die Therapie mit rekombinanten IL6 bewirkt eine vergleichbare Verringerung der Serumkonzentrationen von TNF im Verlauf der ConA Hepatitis¹⁸. Die Werte sind auch in diesem Fall um 40-50 % reduziert, der Leberschaden ist dabei nahezu vollständig inhibiert. Me3738 induziert per se einen Anstieg der IL6 Serumkonzentrationen (siehe Abb. 3.6 und 3.10). Dies ist ein wichtiger Aspekt, der eine ME3738 abhängige IL6 Sekretion als Hauptursache der vermittelten hepatoprotektiven Effekte erscheinen lassen.

4.5.2 Me3738 Therapie reduziert die hepatische NF κ B Aktivierung:

Die generelle Bezeichnung NF κ B beschreibt dimere Transkriptionsfaktoren, bestehend aus homo- oder heterodimerisierten Proteinen der rel-Familie¹⁰¹.

RelA (p65), RelB und cRel weisen Transaktivierungsdomänen auf und sind in Form aktivierter Dimere in der Lage, die Transkription spezifischer Zielgene zu initiieren¹⁰¹.

Die Proteine p50 und p52 werden in Form der inaktiven Vorläuferproteine p105 bzw. p100 expremiert, die durch posttranslationale, proteolytische Modifikationen in aktive Formen überführt werden. Sie weisen keine Transaktivierungsdomänen auf, sind aber dennoch in der Lage Gentranskription zu regulieren¹⁰².

NFkB vermittelt in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Identität der aktivierten Untereinheit sowohl anti- als auch pro-apoptotische Signale. So kann die Inaktivierung von NfκB apoptotische Signale verstärken¹⁰³. Die spezifische Inaktivierung von NFκB p65 in der Maus führt zu embryonaler Letalität aufgrund vermehrter Apoptose von Leberzellen^{104,105}. NFκB p65^{-/-} Tiere sind sensitiver gegenüber TNF Stimulation¹⁰⁵.

Der Verlauf verschiedener humaner und tierexperimenteller Lebererkrankungen ist assoziiert mit der hepatischen Aktivierung von NFκB^{106,107,25}.

ME3738 Behandlung führt zu verringerten TNF Serumkonzentrationen nach ConA Injektion. Damit korreliert die verringerte hepatische Aktivierung und Translokation von NFκB (siehe Abb. 3.7). Insbesondere 8 h nach ConA Injektion, dem Beginn der detektierbaren Erhöhung der Aktivität der Serumtransaminasen, ist durch ME3738 Behandlung eine deutliche Reduktion der NFκB Aktivität nachweisbar (siehe Abb.3.3 A/B).

Auffallend ist die Aktivierung von NFκB p50 Komplexen durch ME3738. Die Vorbehandlung der Tiere führt zu einer spezifischen nukleären Translokation der NFκB p50 Untereinheit (siehe Abb. 3.7 und 3.22).

Durch die Experimente an IL6^{-/-} und hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass die NFκB p50 Aktivierung IL6/gp130 abhängig in nicht Hepatozyten initiiert wird. Die IL6 abhängige NFκB Induktion ist zelltypspezifisch und zudem beschränkt auf die p50 Untereinheit.

Diese Spezifität ist angesichts der Ereignisse, die intrazellulär zum Import von NFκB Komplexen in den Kern führen, beachtenswert. NFκB liegt im Zytoplasma komplexiert mit endogenen Inhibitoren der IκB Familie vor¹⁰⁹. NFκB aktivierende Signale führen zum Abbau von IκB und zur Translokation der frei werdenden NFκB Komplexe in den Kern¹⁰⁹.

Im Fall der ME3738 induzierten p50 Translokation wird eine Signalkaskade aktiviert, die spezifisch p50 Komplexe freisetzt. NFκB p50 Homodimere besitzen DNA Bindungsaktivität, eine Transaktivierungsdomäne aber fehlt dem Komplex. Dennoch sind für aktivierte p50 Komplexen regulatorische Effekte, insbesondere bei der Modulation der Aktivität von Immunzellen, beschrieben. So führt eine verstärkte Aktivierung von p50 in Makrophagen zu einer Reduktion der LPS induzierten TNF Sekretion

¹⁰⁸.

Zusätzlich führt die ektopische Überexpression von p50 zu einer reduzierten transkriptionellen Aktivierung des murinen TNF-Promotors¹⁰⁸. Bei transgenen Mäusen, die ein C-terminal trunkiertes p105 Molekül exprimieren, ist eine verstärkte nukleäre Präsenz von p50 Untereinheiten nachweisbar. p105 ist das inaktive p50 Vorläufermolekül. Erst durch proteolytische Abspaltung des C-Terminus wird p105 in das transkriptionell aktive p50 Degradationsprodukt überführt¹⁰⁹. Die verstärkte p50 Expression in diesen p105 transgenen Tieren resultiert in einer reduzierten Transkription von NFκB Zielgenen¹¹⁰.

Es könnten jedoch auch transkriptionsaktivierende Effekte für die p50 Untereinheiten nachgewiesen werden. Die Interaktion mit dem Protein Bcl3 führt zur Transaktivierung spezifischer Zielgene¹⁰².

P50 Komplexe könnten so u. a. eine Funktion bei der Regulation der Transkription von Genen spielen, die an der Auflösung entzündlicher Prozesse eine Rolle spielen. Aktivierte Makrophagen sekretieren Prostaglandine¹¹¹. Diese lipiden Mediatoren modulieren die akute Immunreaktion. Die Synthese von Prostaglandinen wird durch Zyklooxygenasen reguliert. Bis dato sind zwei Gene bekannt, die Zyklooxygenasen kodieren. Cox1 ist konstitutiv exprimiert und ist u. a. essentiell für die Funktion gastrointestinaler Gewebe¹¹¹. Cox2 ist in den meisten Geweben nur in geringem Ausmaß exprimiert, wird aber durch eine Reihe von Hormonen, Mitogenen oder anderen Liganden transkriptionell stimuliert¹¹². Die transkriptionelle Aktivität des Gens Cox2 wird u. a. p50 abhängig reguliert¹¹³.

Die Rolle der p50 Aktivierung im Rahmen der Hepatoprotektion nach ME3738 Therapie bedarf weiterführender Untersuchungen. Erst die Klärung welcher Zelltyp der Leber sensitiv für die ME3738 induzierte p50 Aktivierung ist, wird eine genauere Einordnung dieses Effekts ermöglichen.

4.5.3 ME3738 Therapie senkt die IL6 Serumkonzentrationen im Verlauf der ConA Hepatitis:

Neben der Inhibition der TNF/NFκB abhängigen Signalwege reduziert die ME3738 Therapie im Verlauf der akuten ConA Hepatitis die IL6 Serumkonzentrationen. Dieser Effekt ist von der ME3738 abhängigen IL6 Induktion zu unterscheiden. Die verringerte

ten IL6 Konzentration im Verlauf der Erkrankung ist mit reduzierter Leberschädigung assoziiert.

Bei verschiedenen akuten und chronischen humanen Lebererkrankungen korreliert die IL6 Serumkonzentration mit der Initiierung oder der Intensität des Krankheitsverlaufs. So wurden bei Patienten mit akuten und chronischen HBV Infektionen signifikant erhöhte IL6 Serumwerte gemessen ^{114,115}. Chronische HCV Infektionen sind assoziiert mit erhöhten Konzentrationen des Zytokins im Serum betroffener Patienten ^{116,117}. Gleiches gilt für die Alkohol induzierte Hepatitiden ¹¹⁸.

Ob die IL6 Serumkonzentrationen ausschließlich als Zeichen einer hepatoprotektiv wirksamen Abwehrreaktion zu deuten sind, ist nicht abschließend zu beantworten. Möglicherweise wirken über längere Zeiträume auf hohem Niveau verbleibende IL6 Konzentrationen in Hepatozyten schädigend. So führt IL6 in Hepatozyten zu einer erhöhten Expression des TNF-RI ^{119,120,121}. TNF wird sehr früh im Verlauf der ConA Hepatitis sezerniert ²⁵. Die erhöhten IL6 Serumkonzentrationen der unbehandelten Mäuse, im Vergleich zu den reduzierten Werten der ME3738 therapierten Tiere, könnten zu einer erhöhten Expression von TNF Rezeptoren führen und damit die Zytotoxizität des sezernierten TNF verstärken.

Diese Möglichkeit wird unterstützt durch Untersuchungen die zeigen, dass in der ConA Hepatitis der Zeitpunkt der Applikation rekombinanten IL6 von Bedeutung ist. Führt IL6 Gabe vor der ConA Injektion zu Hepatoprotektion, so ist das Ausmaß des ConA induzierten Leberschadens erhöht wenn exogenes IL6 3 h - 6 h nach der Initiierung der Hepatitis injiziert wird ¹⁸. Eine zusätzliche exogene Applikation von IL6 erhöht die Konzentrationen des Zytokins im Serum in nicht physiologische Bereiche. Nicht physiologische Konzentrationen entzündungsmodulierender Mediatoren könnten zu Effekten führen die nicht den eigentlichen Funktionen des Proteins entsprechen.

Gegen hepatozytenschädigende Effekte von IL6 bei der akuten ConA induzierten Leberentzündungen sprechen die Ergebnisse der ConA Hepatitis in IL6-/- Tieren. Es gibt zumindest in den ersten 24 h der Hepatitis keine signifikanten Veränderungen in Bezug auf die Leberzellschäden (vergleiche Abb. 3.3 mit Abb. 3.23). Eine ausbleibende IL6 Sekretion wirkt in der Initialphase dieses Schädigungsmodells nicht hepatoprotektiv.

4.5.4 ME3738 Therapie verstärkt die STAT3 Aktivierung im Verlauf der ConA Hepatitis:

Dass in der Frühphase der Con A Hepatitis erhöhte IL6 Serumkonzentrationen protektiv wirken, belegen die Auswirkungen der ME3738 Therapie. Die durch ME3738 Applikation freigesetzten IL6 Konzentrationen sind verglichen mit den durch ConA induzierten Mengen des Zytokins eher gering. Dennoch bewirken sie einen effektiven Schutz der Leber.

Durch die ME3738 induzierte IL6 Freisetzung wird der Transkriptionsfaktor STAT3 aktiviert. Im Vergleich zu nicht therapierten Mäusen ist die STAT3 Aktivierung in der Frühphase der Con A Hepatitis erhöht (Abb. 3.8).

Verstärkte STAT3 vermittelte anti-apoptotische Signale oder eine intensiviertere Akut-Phase-Genexpression könnte zu dem ME3738 vermittelten Schutz beitragen. Die SAA Serumkonzentrationen sind im Verlauf der Con A Hepatitis bei ME3738 therapierten Mäusen verglichen mit nicht therapierten Tieren erhöht (Abb. 3.30). Zu dem Zeitpunkt maximaler TNF vermittelter Schädigung wird durch ME3738 Therapie bereits eine hohe Konzentration von SAA im Serum induziert. Die diskutierten inhibitorischen Wirkungen einer hohen SAA Konzentration auf die TNF vermittelte Toxizität könnten die protektiven Effekte der ME3738 Therapie erklären (siehe 4.4.1).

4.6 Bei IL6^{-/-} und hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen wirkt ME3738 Therapie in der ConA Hepatitis nicht protektiv:

Die Analysen der transgenen Mäuse in Bezug auf die ME3738 Therapie im ConA Modell machen deutlich, dass die Substanz mittels des induzierten IL6/gp130 Signalweges Hepatozyten vor dem Zelluntergang bewahrt.

Sowohl in IL6^{-/-} Mäusen als auch in den hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen ist keine ME3738 induzierbare Protektion zu beobachten (vergleiche Abb.3.3. (Wildtyp-Mäuse) mit Abb. 3.23 (IL6^{-/-} Mäuse) und Abb. 3.24 (hepatozytenspezifische gp130^{-/-} Mäuse)). Die genauere Untersuchung der gp130^{-/-} Tiere lässt aber auf eine Sensitivierung der Tiere gegenüber ConA Injektion in der Rekonvaleszenzphase schließen.

4.7 Gp130^{-/-} Tiere sind sensitiver gegenüber ConA induzierter Hepatitis:

Die Überlebensrate hepatozytenspezifischer gp130^{-/-} Tiere ist gegenüber den Wildtyp Mäusen verringert (Abb. 3.25). Dabei scheint sich die Sensitivierung gegenüber der ConA induzierten Hepatitis erst in der Spätphase der Erkrankung bemerkbar zu machen. In Wildtyp- und hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen kommt es zu einer Erhöhung der Aktivität der Serumtransaminasen. Ist in Wildtyp Tieren schon 8h nach ConA Injektion ein detektierbarer Level der Serumtransaminasen festzustellen, steigen die Werte in den hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen etwas später an. Eine genauere Analyse kann aber erst nach der Erhebung zusätzlicher Messwerte zwischen 8 h und 24 h nach ConA Injektion durchgeführt werden.

Die TNF Serumkonzentrationen steigen in beiden Gruppen in einem vergleichbaren Ausmaß an (Abb. 3.26). Die etwas später eintretende Zerstörung von Leberzellen in hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen könnte durch die schon diskutierten Effekte von IL6 auf die Expression von TNF Rezeptoren erklärt werden (siehe 4.5.3). Zumindest in Hepatozyten sollten in diesen Tieren die IL6/gp130 abhängigen Effekte nicht mehr induzierbar sein. Da TNF schon kurz nach Initiierung der ConA Hepatitis sein Maximum erreicht, dürften sich besonders in der Frühphase die TNF vermittelten, leberschädigenden Signalwege auswirken. Eine verstärkte Expression von TNF Rezeptor könnte die leberschädigenden Prozesse potenzieren.

Die Analyse der STAT Aktivierung nach ConA Injektion stützt die Vermutung, dass hepatozytär IL6/gp130 vermittelte Signale in den transgenen Tieren nicht induziert werden. Es ist keine STAT3 DNA Bindung detektierbar. Dieses Ergebnis belegt, dass ConA ausschließlich in Hepatozyten STAT3 Signalwege induziert.

Bleibt die gp130 abhängige STAT3 Aktivierung aus, erhöht sich die Letalität im Verlauf der ConA Hepatitis (Abb. 3.24 und 3.25).

Die ConA induzierte STAT1 Aktivierung hingegen ist bei den hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen weiterhin nachweisbar. Neuste Untersuchungen an STAT1 knockout Mäusen deuten auf eine verringerte Sensitivität dieser Tiere in Bezug auf die ConA induzierte Hepatitis. Zudem scheint STAT1 vornehmlich IFN γ abhängig aktiviert zu werden (Hong et al., 2002 unveröffentlichte Daten). Die erhöhte Sensitivität der hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäuse könnte also durch das Fehlen der gp130 vermittelten, protektiven Signale - bei gleichzeitigem Aufrechterhalten der STAT1 vermittelten leberschädigenden Effekte - erklärbar sein.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die reduzierte Expression von Socs3 in hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen. Socs3 inhibiert u. a. die IFN γ vermittelte Signaltransduktion und schützt β -Zellen vor IFN γ induzierter Toxizität^{122,123}. IFN γ vermittelt in der ConA Hepatitis zellschädigende Prozesse. Die IFN γ Serumkonzentrationen erreichen zwischen 4 und 8h nach ConA Injektion das Maximum¹²⁴. Bei hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Tieren ist 4h nach ConA Injektion die Socs3 Genexpression reduziert (Abb. 3.30). Es fehlen somit zellprotektive Einflüsse. Wenn die Ergebnisse der Socs3 vermittelten β -Zell Protektion im Verlauf IFN γ induzierter Toxizität auf Hepatozyten übertragbar wären, könnte dieser Effekt ein weiterer Erklärungsansatz für die erhöhte ConA Sensitivität der Tiere sein.

4.7.1 Der Verlauf der IL6 Konzentrationsänderungen im Serum Con A injizierter gp130^{-/-} Mäuse ist gegenüber Wildtyp Mäusen verändert

Korrelierend mit dem später einsetzenden Leberschaden, steigen die IL6 Serumwerte bei gp130^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Tieren später an (Abb. 3.28). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass maximale IL6 Konzentrationen als Reaktion auf die Zerstörung von hepatischem Gewebe induziert werden.

In Wildtyp Mäusen ist das Maximum der IL6 Konzentration nach 8h erreicht und geht danach stetig zurück. Wird durch ME3738 Therapie Leberschutz induziert, so erreichen die IL6 Konzentrationen schon nach 3h die höchsten Werte. Durch die Therapie wird die Zerstörung von Gewebe verhindert. Die IL6 Werte gehen bis 8h nach ConA Applikation nahezu auf das Ausgangsniveau zurück (Abb. 3.28 A).

Bei den hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} Mäusen kommt es dagegen zu einem kontinuierlichen Anstieg der IL6 Serumkonzentrationen. In diesen Tieren bleibt die Rekonvaleszenzphase aus. Wahrscheinlich ist, dass eine IL6/gp130 vermittelte Reduktion der Entzündungsreaktion durch die hepatozytäre Deletion des Rezeptors gp130 nicht mehr vermittelt werden kann.

Die nachhaltig erhöhten IL6 Konzentrationen könnten damit zu erklären sein, dass Signale ausbleiben, die eine entzündungsabhängige Autoregulation vermitteln. Es erscheint wahrscheinlich, dass im Rahmen einer physiologischen Entzündungsreaktion nach dem Abklingen der Symptome die Normalisierung der induzierten Abwehr-

mechanismen eingeleitet wird. Im Zuge dieser Normalisierung könnten Signale aktiviert werden, die zur Reduktion der IL6 Expression führen.

4.8 Der Einsatz von ME3738 und IL6 im Rahmen einer anti-Hepatitis Therapie

Welche längerfristigen Auswirkungen die Therapie mit rekombinanten IL6 oder ME3738 haben werden, ist bis dato nicht endgültig zu beantworten.

Als Voraussetzung für die angestrebte Zulassung von ME3738 als Therapeutikum im Rahmen akuter und chronischer Lebererkrankungen sind aktuell Phase 1 Studien in Japan initiiert worden. Diese Toxizitätsuntersuchungen werden genauere Aussagen bezüglich nachteiliger Effekte einer längerfristigen Behandlung ermöglichen. Des Weiteren ist nicht abschließend geklärt, inwieweit durch wiederholte ME3738 Applikation die IL6 Serumkonzentrationen nachhaltig erhöht werden. Die Ergebnisse dieser Dissertation belegen, dass die protektiven Effekte vornehmlich über den IL6/gp130 abhängigen Signalweg vermittelt werden. Sollte die ME3738 induzierte IL6 Freisetzung tatsächlich auf ME3738 vermittelte posttranskriptionelle Effekte beruhen, ist die Kinetik der IL6 Freisetzung genauer zu untersuchen.

Die Ergebnisse der „Phase-1“ Studie in Japan werden schon bald zur Klärung dieser Fragestellung beitragen.

5 ZUSAMMENFASSUNG:

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Analyse der ME3738 induzierten molekularen Mechanismen, die im Verlauf der ConA induzierten experimentellen Hepatitis zu einer Protektion der Leber führen.

Das Ergebnis der Untersuchungen ist, dass die Therapie mit ME3738 zu einem Anstieg der IL6 Konzentrationen im Serum führt. Im Modell der ConA induzierten Hepatitis vermittelt dieser Mechanismus den Schutz der Leber. Die Bildung nekrotischer Areale und der Anstieg der Aktivität der Serumtransaminasen werden durch die Behandlung mit ME3738 inhibiert.

ME3738 aktiviert protektive Signalkaskade, die durch den Rezeptor gp130 vermittelt werden. In Hepatozyten wird durch gp130 zytoplasmatisches STAT3 aktiviert und in den Kern transloziert. Nukleäres STAT3 vermittelt die Transkription spezifischer Zielgene. Für die ME3738 abhängige und IL6 induzierte SAA2 Transkription und Proteinexpression ist die Präsenz des Rezeptors gp130 in Hepatozyten essentiell.

Die ConA Injektionsexperimente an hepatozytenspezifischen gp130^{-/-} bzw. an IL6^{-/-} Mäusen belegen, dass die ME3738 induzierte Protektion im ConA Modell spezifisch über die Aktivierung IL6/gp130 abhängiger Signalkaskaden in Hepatozyten vermittelt wird.

Fehlt der Rezeptor gp130 in Hepatozyten ist weder durch ME3738 Therapie noch durch Injektion von rekombinanten IL6 ein Schutz der Leber im Verlauf der ConA Hepatitis zu induzieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Regulierung IL6/gp130 abhängiger Signalwege in der Leber ein mögliches therapeutisches Ziel für die Behandlung inflammatorischer Lebererkrankungen darstellen kann.

6 LITERATUR

1. Nelson D. R., Koymans L., Kamatki T., Stegeman J. J., Federalise R., Waxman D. J. (1996): P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6:1-42
2. Higgins G. M., Anderson R. M. (1931): Experimental pathology of liver. I. Restoration of liver of white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* 12: 186-202
3. Mohn K. L., Laz T. M., Melby A. E., Taub R. (1990): Immediate-early gene expression differs between regenerating liver, insulin-stimulated H-35 cells, and mitogen-stimulated Balb/c 3T3 cells. Liver-specific induction patterns of gene 33, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and the jun, fos, and egr families. *J Biol. Chem.* 265(35):21914-21
4. Crossman D. E., Diamond R. H., Taub R. (1995): Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology* 21: 1443-1449
5. Trautwein C., Rakemann T., Inhofe M., Rose-John S., Mann's M.P. (1996): Acute-phase response factor, increased binding and target gene transcription during liver regeneration. *Gastroenterology* 114: 1035-1045
6. Ferrell L., Wight T., Lake J., Roberts J., Asher N. (1992): Incidence and diagnostics features of macro regenerative nodules vs. small Hepatocellular Carcinoma in cirrhotic livers. *Hepatology* 16:1372-1381
7. Barossa P., Hoodlum K., Tauten C., Hostage A., Chokier M. (1994): Stimulation of collagen α 1-gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis. *Hepatology* 19:1262-1271
8. Lee M. W. (2000): Hepatitis B virus infection. *N.E.J. Med.* 337: 1733-1745
9. Gonzales-Anaro R., Garcia Moncon C., Garcia Buey R., Moreno Otero J., Lonso J. L., Yage E., Pivel J. P., Lopez Cabrera M., Fernandez Ruiz E., Sanchez Madrid F. (1994): Induction of tumor necrosis factor α production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *J. Exp. Med.* 179:841-848
10. Kowdel R. V. (1999): TNF in chronic hepatitis C: a smoking gun? *Am. J. Gastroenterol.*, 94, 1132-1135

11. Fransen L., Ruyschaert M. R., Van der Heyden J., Fiers W. (1986): Recombinant tumor necrosis factor: species specificity for a variety of human and murine transformed cell lines. *Cell Immunol.*, 100: 260-267
12. Leist M., Gantner F., Jilig S., Wendel A. (1995): Activation of the 55kDa TNF receptor is necessary and sufficient for TNF induced liver failure, hepatocyte apoptosis and nitrite release. *J Immunol.*, 154: 1307-1316
13. Tiegs G., Hetschel J., Wendel A. (1992): A T-cell dependent experimental liver injury in mice inducible by Concanavalin A. *J. Clin. Invest.*, 90: 196-203
14. Gantner F., Leist M., Lohse W., Germann P.G., Tiegs G. (1995): Concanavalin A induced T-cell mediated hepatic injury in mice: the role of TNF α . *Hepatology*, 21: 190-198
15. Tojabe S., Seki S., Takeda T., Shirai K., Watanabe H. (1997): Requirement for IL4 and liver NK1+ T-cells for concanavalin-A induced hepatic injury in mice. *J. Immunol.*, 159:1537
16. Takeda, K., Hayakawa, Y., Van Kaer, L., Matsuda, H., Yagita, H., Okumura, K. (2000): Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 5498-503.
17. Kaneko, Y., Harada, M., Kawano, T., Yamashita, M., Shibata, Y., Gejyo, F., Nakayama, T., Taniguchi, M. (2000): Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J. Exp. Med.* 191: 105-114.
18. Mizuhara H, O'Neill E, Seki N, Ogawa T, Kusunoki C, Otsuka K, Satoh S, Niwa M, Senoh H, Fujiwara H. (1994): T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *J. Exp. Med.* 179(5):1529-37.
19. Küsters S., Gantner F., Künstle G., Tiegs G. (1996): Interferon gamma plays a critical role in T cell dependent liver injury in mice initiated by concanavalin a. *Gastroenterology*, 111: 462-471
20. Küsters S, Tiegs G, Alexopoulou L, Pasparakis M, Douni E, Künstle G, Bluethmann H, Wendel A, Pfizenmaier K, Kollias G, Grell M. (1997): In vivo evidence for a functional role of both tumor necrosis factor (TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis. *Eur. J. Immunol.* 27: 2870-5.

21. Streetz K., Fregien B., Plumpe J., Korber K., Kubicka S., Sass G., Bischoff S.C., Manns M.P., Tiegs G., Trautwein C. (2001): Dissection of the intracellular pathways in hepatocytes suggests a role for Jun kinase and IFN regulatory factor-1 in Con A-induced liver failure. *J. Immunol.* 167: 514-23.
22. Louis H., Le Moine O., Peny M. O., Quertinmont E., Fokan D., Goldman M., Deviere J. (1997): Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 25: 1382-9.
23. Schindler R., Mancilla J., Endres S., Ghorbani R., Clark S. C., Dinarello C. A. (1990): Correlations and Interactions in the production of IL6, IL1 and tumor necrosis factor in human blood mononuclear cells: IL6 suppresses IL1 and TNF. *Blood* 75:40,
24. Kovalovich K., Li W., DeAngelis R., Greenbaum L.E., Ciliberto G., Taub R. (2001): Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* 276: 26605-13.
25. Trautwein C., Rakemann T., Malek N. P., Plümpe J., Tiegs G., Manns M.P. (1998): Concanavalin-A-induced liver injury triggers hepatocyte proliferation. *J Clin Invest.*; 101: 1960-9.
26. Nicola N.A., (ed.) (1994): Guidebook to cytokines and their receptors. Oxford University Press, New York
27. Gearing D. P., Comeau M .R., Friend D. J., Gimpel S .D., Thut C. J., McGourty J., Brasher K. K., King J. A., Gillis S., Mosley B., Ziegler S. F., Cosman D. (1992): The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 255: 1434-1437
28. Kishimoto T., Akira S., Taga T. (1992): Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 258: 593-597
29. Akira S., Taga T., Kishimoto T. (1993): Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol.* 54: 1-78
30. Taga T., Kawanishi Y., Hardy R. R., Hirano T., Kishimoto T. (1987): Receptors for B cell stimulatory factor 2. *J. Exp. Med.* 166: 967-981
31. Taga T., Kishimoto T. (1997): Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 797-819
32. Yoshida K., Taga T., Saito M., Suematsu S., Kumanogoh A., Tanaka T., Fujiwara H., Hirata M., Yamagami T., Nakahata T., Hirabayashi T., Yoneda Y.,

- Tanaka Y., Wang W. Z., Mori C., Shiota K., Yoshida N., Kishimoto T. (1996): Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and haematological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 407-411
33. Hibi M., Murakami M., Saito M., Hirano T., Taga T., Kishimoto T. (1990): Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 63: 1149-1157
34. Saito M., Yoshida K., Hibi M., Taga T., Kishimoto T. (1992): Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *J. Immunol.* 148: 4066-4071
35. Ward L. D., Howlett G. J., Discolo G., Yasukawa K., Hammacher A., Moritz R. L., Simpson R. J. (1994): High affinity interleukin 6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor and gp130. *J. Biol. Chem.* 269:23286-23289
36. Heaney M.L., Golde D.W. (1996): Soluble cytokine receptors. *Blood* 87: 847-857
37. Diamant M., Rieneck K., Mechti N., Zhang X. G., Svenson M., Bendtzen K., Klein B. (1997): Cloning and expression of an alternatively spliced mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 signal transducer gp130. *FEBS Lett.* 412: 379-384
38. Mullberg J., Schooltink H., Stoyan T., Gunther M., Graeve L., Buse G., Mackiewicz A., Heinrich P. C., Rose-John S. (1993): The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol.* 23(2):473-80.
39. Taga T. (1997): The signal transducer gp130 is shared by interleukin-6 family of haematopoietic and neurotrophic cytokines. *Ann. Med.* 29: 63-72
40. Stahl N., Boulton T. G., Farruggella T., Ip N. Y., Davis S., Witthuhn B. A., Quelle F. W., Silvenoinen O., Barbieri G., Pellegrini S., Ihle J. N., Yanopoulos G. D. (1994): Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 β receptor components. *Science* 263: 92-95
41. Stahl N., Farruggella T. J., Boulton T. G., Zhong Z., Darnell J. E. Jr., Yanopoulos G. D. (1995): Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267: 1349-1353

42. Heinrich P. C., Behrmann I., Muller-Newen G., Schaper F., Graeve L. (1998): Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp30/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 334(Pt2): 297-314
43. Starr R., Willson T. A., Viney E. M., Murray L. J. L., Rayner J. R., Jenkins B. J., Gonda T. J., Alexander W. S., Metcalf D., Nicola N. A., Hilton D. J. (1997): A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387: 917-921
44. Fukada T., Hibi M., Yamanaka Y., Takahashi-Tezuka M., Fujitani Y., Yamaguchi T., Nakajima K., Hirano T. (1996): Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 5: 449-460
45. Akira S., Yoshida K., Tanaka T., Taga T., Kishimoto T. (1995): Targeted disruption of the IL-6 related genes: gp130 and NF-IL-6. *Immunol. Rev.*; 148: 221-253
46. Kawasaki K., Gao Y-H., Yokose S., Kaji Y., Nakamura T., Suda T., Yoshida K., Taga T., Kishimoto T., Kataoka H., Yuasa T., Norimatsu H., Yamaguchi A. (1997): Osteoclasts are present in gp130-deficient mice. *Endocrinology* 138: 4959-4965
47. Yoshida K., Taga T., Sato M., Kumanogoh A., Tanaka T., Ozono K, Nakayama M., Nakahata T., Yoshida N., Kishimoto T. (1997): Myocardial, hematological, and placenta disorders caused by targeted disruption of gp130, a common signal transducer for IL-6 family of cytokines. In: *Contemporary Immunology: Cytokine Knockouts*. Ed.: Durum S.K., Muegge K., Humana Press Inc., Totowa, NJ:
48. Kopf M., Baumann H., Freer G., Freudenberg M., Lamers M., Kishimoto T., Zinkernagel R., Bluethmann H., Köhler G. (1994): Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368: 339-342
49. Romani L., Mencacci A., Cenci E., Spaccapelo R., Toniatti C., Pucetti P., Bistoni F., Poli V. (1996): Impaired neutrophil response and CD4⁺ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with candida albicans. *J. Exp. Med.* 183: 1345-1355
50. Suzuki Y., Rani S., Liesenfeld O., Kojima T., Lim S., Nguyen T. A., Dalrymple S. A., Murray R., Remington J. S. (1997): Impaired resistance to the development of toxoplasmic encephalitis in interleukin-6-deficient mice. *Infect. Immun.* 65: 2339-2345

51. Dalrymple S. A., Lucian L. A., Slattery R., McNeil T., Aud D. M. Fuchino S., Lee F., Murray R. (1995): Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: Correlation with inefficient neutrophilia. *Infect. Immun.* 63: 2262-2268
52. Romano M., Sironi M., Toniatti C., Polentarutti M., Fruscella P., Ghezzi P., Faggioni R., Luini W., Van Hinsbergh V., Sozzani S., Bussolino F., Poli V., Ciliberto G., Matntovani A. (1997): Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 6: 315-325
53. Kushner I. (1982): The phenomenon of the acute phase response. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 389: 39-48
54. Baumann H., Gauldie J. (1994): The acute phase response. *Immunology Today* 15:74-80
55. Mortensen R. F., Beisel K., Zeleznik N. J., Le P. T. (1983): Acute-phase reactants of mice. II. Strain dependence of serum amyloid P-component (SAP) levels and response to inflammation. *J. Immunol.* 130: 885-889
56. Baumann H., Gauldie J. (1990): Regulation of the hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol. Biol. Med.* 7: 147-159
57. Benigni F., Fantuzzi G., Sacco S., Sironi M., Pozzi P., Dinarello C.A., Sipe J.D., Poli V., Cappelletti M., Paonessa G., Pennica D., Panayotatos N., Ghezzi P. (1996): Six different cytokines that share gp130 as a receptor subunit, induce serum amyloid A and potentiate the induction of interleukin-6 and the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by interleukin-1. *Blood*, 87: 1851-1854
58. Steel D. M. and Whitehead A. S.: *Imunol. Today*;15: 81-88:
59. Shimizu H., Yamamoto K. (1994): NF-kappa B and C/EBP transcription factor families synergistically function in mouse serumamyloid A gene expression induced by inflammatory cytokines. *Gene* 149(2):305-10
60. Li X.X., Huang J.H., Rienhoff H.Y., Liao WS (1990): Two adjacent C/EBP-binding sequences that participate in the cell-specific expression of the mouse serum amyloid A3 gene. *Mol Cell Biol* 0(12):6624-31
61. Hayat S., Raynes J.G. (1997): Serum amyloid A has little effect on high density lipoprotein (HDL) binding to U937 monocytes but may influence HDL mediated cholesterol transfer. *Biochem Soc Trans* 25(2):348

62. Badolato R., Wang J. M., Murphy W. J., Lloyd A. R., Michiel D. F., Bausserman L. L. , Kelvin D. J., Oppenheim J. J. (1994): Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 180(1):203-9
63. Brinckerhoff C. E., Mitchell T. I., Karmilowicz M. J., Kluge-Beckerman B., Benson M. D. (1989): Autocrine induction of collagenase by serum amyloid A-like and beta 2-microglobulin-like proteins. *Science* 243(4891):655-7
64. Van Dam M., Müllberg J., Schootlink H., Stoyan T., Brakenkoff J., Heinrich P.C., Rose-John S. (1993): Structure-function analysis of interleukin-6 utilizing human/murine chimeric molecules: involvement of two separate domains in receptor binding. *J. Biol. Chem.* 268: 15285-15290
65. Descombes P., Chojkier M., Lichtsteiner S., Falvey E., Schibler U. (1990): LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes & Dev.* 4: 1541-1551
66. Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
67. Lämmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
68. Maniatis T., Goodbourn S., Fischer J. A. (1987): Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 236: 1237-1244
69. Singh H., Sen R., Baltimore D., Sharp P. A. (1986): A nuclearfactor that binds to a conserved sequence motive in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature* 319: 154-158
70. *Z. klein. Chem. u. klein. Biochem.* 8, (1970), 658; 10 1972, 182
71. Church G. M., Gilbert W. (1984): Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991-1995
72. Trautwein C, Rakemann T, Brenner D. A., Streetz K, Licato L, Manns M. P., Tiegs G. (1998): Concanavalin A-induced liver cell damage: activation of intracellular pathways triggered by tumor necrosis factor in mice. *Gastroenterology.* 114: 1035-45.
73. Kuzuhara H, Nishiyama S, Minowa N, Sasaki K, Omoto S. (2000): Protective effects of soyasapogenol A on liver injury mediated by immune response in a concanavalin A-induced hepatitis model. *Eur J Pharmacol.* 391: 175-81.

74. Rakemann T, Niehof M, Kubicka S, Fischer M, Manns MP, Rose-John S, Trautwein C. (1999): The designer cytokine hyper-interleukin-6 is a potent activator of STAT3-dependent gene transcription in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 274: 1257-66.
75. Betz U. A., Bloch W., van den Broek M., Yoshida K., Taga T., Kishimoto T., Addicks K., Rajewsky K., Muller W. (1998): Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, cardiac, hematopoietic, immunological, hepatic, and pulmonary defects. *J. Exp. Med.* 188(10): 1955-65
76. Kinjo J., Udayama M., Nohara T. (1999): Study of structure-hepatoprotective relationships of olean-type triterpenoidal glucuronides obtained from several fabaceous plants on rat hepatocyte cultures. *Biol. Pharm. Bull*, Feb; 22 (2),:203-6
77. Gordon M. Y. (1991): Hemopoietic growth factors and receptors: bound and free. *Cancer Cells* 4:127-33
78. Benzra M., Vlodavsky I., Ishai-Michaeli R., Neufeld G., Bar-Shavit R. (1993): Thrombin induced release of active fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from subendothelial extracellular matrix. *Blood*, 81 (12): 3324-31
79. Vlodavsky I., Fuks Z., Ishai-Michaeli R, Bashkin P., Levi E., Korner G., Bar-Shavit R., Klagsbrunn M. (1991): Extracellular matrix-resident basic fibroblast growth factor: implication for the control of angiogenesis. *J. Cell Biochem.* 45 (2): 167-76
80. Gordon M. Y., Riley G. P., Watt S. M., Greaves M. F. (1987): Compartmentation of a Hemopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature* 326: 403-5
81. Roberts R., Galagher J., Spooner E., Alla T. D., Bloomfield F., Dexter T. M. (1987): Heparan sulfate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated hemopoiesis. *Nature* 332: 376-8
82. Somers W., Stahl M., Seehra S. (1997): 1.9 Å crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signalling. *EMBO J.* 16: 989-997
83. Peters M, Jacobs S, Ehlers M, Vollmer P, Mullberg J, Wolf E, Brem G, Meyer zum Buschenfelde KH, Rose-John S. (1996): The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor

- transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6. *J. Exp. Med.* 18: 1399-406.
84. Muller-Newen G, Kuster A, Hemmann U, Keul R, Horsten U, Martens A, Graeve L, Wijdenes J, Heinrich PC. (1998): Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses. *J. Immunol.* 161: 6347-55.
 85. Ramadori G., Sipe J. D., Dinarello C. A., Mizel S. B., Colten H. R. (1985): Pre-translational modulation of acute phase hepatic protein synthesis by murine recombinant interleukin 1 (IL-1) and purified human IL-1. *J. Exp. Med.* 162(3):930-42.
 86. Weinstein JA, Taylor JM. (1987): Interleukin-1 and the acute-phase response: induction of mouse liver serum amyloid A mRNA by murine recombinant interleukin-1. *J Trauma* 27(11):1227-32
 87. Niff P. A., Stewart C., Sullivan J., Showell H. J., Gabel C. A. (1995): Synovial fluid from rheumatoid arthritis patients contains sufficient levels of IL-1 beta and IL-6 to promote production of serum amyloid A by Hep3B cells. *Cytokine.* 7(2):209-1
 88. Rokita H., Loose L. D., Bartle L. M., Sipe J. D. (1994): Synergism of interleukin 1 and interleukin 6 induces serum amyloid A production while depressing fibrinogen: a quantitative analysis. *J. rheumatoid.* 21: 400-405
 89. Bopst M., Haas C., Car B., Eugster H. P. (1998): The combined inactivation of tumor necrosis factor and interleukin-6 prevents induction of the major acute phase proteins by endotoxin. *Eur J Immunol.* 28(12):4130-7.
 90. Ghezzi P, Sipe JD. (1988): Dexamethasone modulation of LPS, IL-1, and TNF stimulated serum amyloid A synthesis in mice. *Lymphokine Res.* Summer (2):157-66.
 91. Stix B., Kahne T., Sletten K., Raynes J., Roessner A., Rocken C. (2001): Proteolysis of AA amyloid fibril proteins by matrix metalloproteinases -1, -2, and -3: *Am. J. Pathol.* 159:561-70
 92. Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H. (1999): MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 99(1):81-92

93. Vu T. H., Shipley J. M., Bergers G., Berger J. E., Helms J. A., Hanahan D., Shapiro S. D., Senior R. M., Werb Z. (1998): MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93(3):411-22
94. Shapiro SD. (1998): Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10(5):602-8
95. Lund L. R., Romer J., Bugge T. H., Nielsen B. S., Frandsen T. L., Degen J. L., Stephens R. W., Dano K. (1998): Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. *EMBO J* 18(17):4645-56
96. Lochter A, Sternlicht M. D., Werb Z, Bissell M. J. (1998): The significance of matrix metalloproteinases during early stages of tumor progression, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 857:180-93
97. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. (1997): Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice., *Science* 277 (5334):2002-4
98. Wielockx B., Lannoy K., Shapido S. D., Itosh T., Itohara S., Vandereckhove J., Libert C. (2001): Inhibition of metalloproteinases blocks lethal hepatitis and apoptosis induced by tumor necrosis factor and allows safe antitumor therapie. *J. Exp. Med.* 7 (11): 12021208
99. Theret N., Lethi K., Musso O., Clement B. (1999): MMP2 activation by collagenase1 and concanavalinA in cultered human hepatic stellate cells. *Hepatology* 30 (2): 462-8
100. Berger M. L., Bhatt H., Combes B., Estabrook R. W. (1986): CCl4-induced toxicity in isolated hepatocytes: the importance of direct solvent injury. *Hepatology* 6(1):36-45
101. Karin M., Ben Neriah Y. (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NFkB activity, *Ann. Rev. Immunol.*, 18: 621-663
102. Bours V., Franzoso G., Azarenko V., Park S., Kanno T., Brown K., Siebenlist U. (1993): The oncoptotein Bcl3 directly transactivate through kB motives via assoziation with DNA binding p50 homodimers. *Cell* 72: 729-739
103. Wang C. Y., Mayo M. W., Baldwin A. S. (1996): TNF and Cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of Nfkb. *Science* 274: 784-787

104. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. (1995): Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376: 167-70.
105. Doi T. S., Marino M. W., Takahashi T, Yoshida T, Sakakura T, Old L. J., Obata Y. (1999): Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96(6):2994-9.
106. Kim W., Hong F., Jaruga B., Hu Z., Fan S., Liang T. J., Gao B (2001): Additive activation of hepatic NFkB by ethanol and hepatitis B protein X (HBX) or HCV core protein: involvement of TNF receptor 1-independent and -dependent mechanisms. *FASEB J.*, 2551-2556
107. Su F., Theodosis C. N., Schneider R. J (2001): Role of Nfkb and Myc proteins in apoptosis induced by hepatitis b virus HBx protein. *J. Virol.* 75:215-25
108. Bohuslav J., Kravchenko V., Parry G. C. N., Erlich J. H., Gerondakis S., Mackman N., Ulevitch R. J. (1998): Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NFkB, *J. Clin. Invest.* 102:1645-1652
109. Beg A. A., Balwin A. S. (1993): The Ikb proteins, multifunctional regulators of Rel/NFkB transcription factors. *Genes Dev.* 7: 2063-2070
110. Ishikawa H., Claudio E., Dambach D., Raventos-Suarez C., Ryan C., Bravo R. (1998): Chronic Inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide p105 precursor (Nfkb1) but expressing p50, *J. Exp. Med.* 187: 985-996
111. Roth G. J., Calverley D. C. (1994): Aspirin, platelets, and thrombosis: theory and practice. *Blood* 15;83(4):885-98
112. Herschman H. R. (1996): Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1299(1):125-40
113. Thomas B., Berenbaum F., Humbert L., Bian H., Bereziat G., Crofford L., Olivivie J. L. (2000): Critical role of C/EBPδ and C/EBPβ factors in the stimulation of the Cox2 gene transcription by interleukin-1β in articular chondrocytes. *Eur. J. Biochem.*, 267:6798-6809
114. Torre D, Zeroli C, Giola M, Ferrario G, Fiori GP, Bonetta G, Tambini R. (1994): Serum levels of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor-necrosis-factor in patients with acute viral hepatitis. *Clin Infect Dis* 18(2):194-8

115. Geneva-Popova M, Murdjeva M. (1999): Study on proinflammatory cytokines (IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha) and IL-2 in patients with acute hepatitis B. *Folia Med (Plovdiv)* 41(1):78-81
116. Oyanagi Y, Takahashi T, Matsui S, Takahashi S, Boku S, Takahashi K, Furukawa K, Arai F, Asakura H. (1999): Enhanced expression of interleukin-6 in chronic hepatitis C. *Liver* 19(6):464-72
117. Cotler S. J., Reddy K. R., McCone J., Wolfe D. L., Liu A., Craft T. R., Ferris M. W., Conrad A. J., Albrecht J, Morrissey M,, Ganger D. R., Rosenblate H., Blatt L. M., Jensen D. M., Taylor M. W. (2001): An analysis of acute changes in interleukin-6 levels after treatment of hepatitis C with consensus interferon. *J. Interferon. Cytokine. Res.* 21(12):1011-9
118. Khoruts A, Stahnke L, McClain C. J., Logan G., Allen J. I. (1991): Circulating tumor-necrosis-factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* 13(2):267-76
119. Dett C. A., Gatanaga M., Inniss E. K., Cappuccini F., Yamamoto R. S., Granger G. A., Gatanaga T. (1991): Enhancement of lymphokine activated T killer cell tumor necrosis factor receptor mRNA transcription, tumor necrosis factor receptor membrane expression, and tumor necrosis factor/lyphotoxine release by IL1 beta, IL4 and IL6 in vitro: *J. Immunol.* 146(5) :1522-6.
120. Van B. S., Liebert C., Fiers W. (1991): Interleukin 6 enhances the expression of tumor necrosis factor receptors on hepatoma cells and hepatocytes. *Cytokine* 3:149
121. Cairnes J. A. (1992) *Immunology*
122. Kovanen PE, Leonard WJ. (1999): Inhibitors keep cytokines in check. *Curr. Biol.* Dec 2;9(23):R899-902
123. Karlsen AE, Ronn SG, Lindberg K, Johannesen J, Galsgaard ED, Pociot F, Nielsen JH, Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Billestrup N. (2001): Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) protects beta -cells against interleukin-1beta - and interferon-gamma -mediated toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98(21):12191-6
124. Mizuhara H, Uno M, Seki N, Yamashita M, Yamaoka M, Ogawa T, Kaneda K, Fujii T, Senoh H, Fujiwara H. (1996): Critical involvement of interferon gamma in the pathogenesis of T-cell activation-associated hepatitis and regulatory

- mechanisms of interleukin-6 for the manifestations of hepatitis. *Hepatology* 23(6):1608-15
- 125 Wüstefeld T, Rakemann T, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. (2000): Hyperstimulation with interleukin 6 inhibits cell cycle progression after hepatectomy in mice . *Hepatology* 32(3):514-22
- 126 Taub R. 1996: Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. *FASEB J.* 10(4): 413-27
- 127 Meiji Investigator Bochure, 2001

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
APS	Ammonium Persulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Celsius
ca.	circa
Ci	Curie
cpm	counts per minute
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat
dGTP	Desoxyguanidintri-phosphat
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtri-phosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N.N.N'.N'-tetraacetat
et al.	und andere
etc.	et cetera
Fa.	Firma
g	Gramm
h	Stunden
HAP	Haptoglobin
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
hIL-6	humanes IL-6
Ig	Imunglobulin
IL	Interleukin
IL-6	Interleukin-6
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare

kBq	Kilobequerel
kD	Kilodalton
konz.	konzentriert(e)
l	Liter
LB	Luria Broth
Leu	Leupeptin
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
m	mili
μ	mikro
M	Mol
min.	Minute(n)
ml	Mililiter
mM	Milimol
MOPS	3-[N-Morpholino]-2-hydroxypropanesulfonic acid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Molecular-weight-marker (Molekulargewicht)
n	nano
NF	Nuclear factor
NK	Negativkontrolle
OD	Optische Dichte
OP	Operation
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PEP A	Pepstatin A
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
PH	partielle Hepatektomie = 2/3-Hepatektomie
PMSF	Phenylmethylsulfonic Fluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
spez.	spezifisch
SSC	Saline-sodium-citrate-buffer
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA-Puffer

TBE	Tris-Borate-EDTA-buffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-buffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TLCK	N-Tosyl-L-Lysine Chloromethyl Ketone
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanine Chloromethyl Ketone
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
u.a.	und andere
UV	ultraviolett
vol.	volume
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen bei Prozentangaben
Y	Phospho-Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

8 VERÖFFENTLICHUNGEN

Originalarbeiten:

Klein C., Heinrich P. C., Manns M. P., Trautwein C., 2002: ME3738 protects from concanavalin A induced liver failure via an IL6-dependent mechanism. J. Immunology, submittet

Wuestefeld T., Klein C., Streetz K.L., Betz U., Buer J., Manns M.P., Müller W., Trautwein C., 2002: IL6/gp130-dependent pathways are protective during liver regeneration. submitted

Streetz K. L., Wüstefeld T., Klein C., Tronche F., Betz U., Schütz G., Manns M. P., Müller W., Trautwein C., 2002: Lack of gp130 expression in hepatocytes promotes liver injury. submitted

Buchberger A, Bonneick S, Klein C, Arnold HH., 2002: Dynamic expression of chicken cMeso2 in segmental plate and somites. Dev. Dyn. ;223 (1):108-18

Buchberger A, Seidl K, Klein C, Eberhardt H, Arnold HH.1998: cMeso-1, a novel bHLH transcription factor, is involved in somite formation in chicken embryos. Dev. Biol. 1998 Jul 15; 199(2):201-15

Übersichtsartikel:

Streetz K.L., Wüstefeld T., Klein C., Manns M.P., Trautwein C., 2001: Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. Cell. Mol. Biol. 47(4): 661-673

Kongressbeiträge:

Klein C., Manns M. P., Trautwein C., 2001: ME3738 protects from ConA liver failure via an IL6 dependend mechanism. Hepatology 34 (4): 584 Part2 Suppl. S, AASLD Dallas

Wuestefeld T., Klein C., Streetz K.L., Betz U., Mueller W., Manns M.P. Trautwein C., 2001: Gp130-dependent pathways are essential in regulating the priming phase and acute phase response after partial hepatectomy. Hepatology 34 (4): 858 Part 2Suppl. S, AASLD Dallas

Klein C., Manns M. P., Trautwein C., 2001: ME3738 protects from ConA liver failure via an IL6 dependend mechanism. J. Hepatology, EASL Dallas

9 LEBENS LAUF

Angaben zur Person:

Name: Christian Klein
Geburtsort: Wolfsburg
Geburtsdatum: 05.04.69
Familienstand: ledig
Aktueller Wohnort: 30171 Hannover, Bandelstr. 37

Schulischer Werdegang:

09.05.1989: Abitur am Otto-Hahn-Gymnasium Gifhorn

Zivildienst:

01.11.89- 31.01.91: St. Cyriakus Kirchengemeinde Braunschweig

Universitärer Werdegang:

Oktober 1991: Beginn des Biologie Studiums (Diplom) an der TU-Braunschweig
07.04.1994: Vordiplom im Studium Biologie an der TU-Braunschweig
April 1997: Abschluss der Diplomprüfungen im Studium Biologie an der TU-Braunschweig
07.1997-08.1998: Diplomarbeit am Institut für Biochemie und Biotechnologie Abt. Zell- und Molekularbiologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. H.H. Arnold
19.08.98: Ausstellung der Urkunde über den Hochschulgrad als Diplom-Biologe
01.09.1998-30.07.99 Institut für Biochemie und Biotechnologie Abt. Zell- und Molekularbiologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. H.H. Arnold
August.1999-Juni 2002 Promotion betreut von Prof. Dr. W. Müller und Prof. Dr. Trautwein, durchgeführt in den Bereichen der Abt. Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover, Prof. Dr. M.P. Manns.
01.07.2002 Rigorosum am Dekanat für Chemie der Universität Hannover

10 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet habe.

Benutzte Hilfsmittel sowie die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen sind vollständig angegeben.

Hannover, im Mai 2002