

**Untersuchungen der Signaltransduktionswege
die zur Aktivierung der Gene
CCL15 (HCC-2) und hPer1 führen**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Biologin Sabine Loumi

geboren am 13. Juli 1970 in Frankfurt am Main

2003

Referent: Prof.Dr. Walter Müller

Koreferent: PD.Dr. Erik Maronde

Tag der Promotion: 18.06.2003

Die Weisheit ist nur in der Wahrheit

[Johann Wolfgang von Goethe]

Zusammenfassung: Inhalt dieser Arbeit ist die Untersuchung der Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung der humanen Gene CCL15 (HCC-2) und *Period1* (*hPer1*) führen. Die Charakterisierung beteiligter Signalmoleküle wurde mittels Luciferase-Reportergen Test in einer humanen Hepatoma Zelllinie (HuH-7) unter Verwendung der Promotorkonstrukte pCC2-luc und *hPER1*-luc durchgeführt. Der Einsatz von pharmakologischen Substanzen und verschiedenen Expressionsplasmiden sollte Aufschluß über putative Mediatoren der Promotorinduktion geben. Expressionsanalysen wurden mittels quantitativer RT-PCR (*TaqMan*[™]) analysiert. Für das CC-Chemokin CCL15 konnte eine weitverbreitete Expression detektiert werden, die in der Leber am höchsten ist. Es konnte weiterhin eine Induzierbarkeit durch die Interleukine IL-1 β und IL-6 sowie die Interferone IFN- α und IFN- γ ermittelt werden. Für die IL-1 β -vermittelte Promotorinduktion konnte eine Beteiligung der Signalmoleküle p38, MAPK, PKA, PI3K und JAK2 nachgewiesen werden. In der IL-6-induzierten Signalweiterleitung wurden MAPK und JAK2 detektiert. PKA beeinflusste die IL-6-medierte Promotoraktivierung nur indirekt. Eine mögliche Beteiligung von CCL15 in Entzündungsprozessen der Leber wird diskutiert. Im Rahmen der Charakterisierung der *hPer1*-Expression wurde ein komplettes peripheres zirkadianes System verwendet. Die *hPER1*-luc-Induktion erfolgt hierbei nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung, wobei es durch CLOCK/BMAL1-Dimere induziert und durch CRY inhibiert wird. Anhand der CLOCK/BMAL1-induzierten Promotoraktivierung konnten zudem zwei weitere putative Signalmoleküle, AP-1 und C/EBP, detektiert werden. Eine CLOCK/BMAL1-unabhängige Promotorinduktion durch PKA und PKC konnte gezeigt werden. Hierbei wurde in der PKA-Signalweiterleitung eine Beteiligung von CREB und C/EBP nachgewiesen, wohingegen der PKC-Signalweg eine Beteiligung von AP-1 zeigt. Die Bedeutung von AP-1 und C/EBP in der CLOCK/BMAL1-vermittelten *hPer1*-Induktion sowie eine Beteiligung von PKA und PKC an der Synchronisation der peripheren Oszillation wird diskutiert.

Schlagerworte: Chemokine, zirkadian, Promotoranalysen

Abstract: Subject of this work was the examination of the signal transduction pathways, which lead to the activation of the liver-expressed human genes CCL15 (HCC-2) and *period1* (*hPer1*). The characterization of these genes was carried out with a luciferase-reportergene assay in a human hepatoma cell line (HuH-7) using pCC2-luc and *hPER1*-luc promoter-constructs. The application of pharmacological substances and different expression plasmids gave new insights into the complex regulation of these genes. The endogenous expression of the CC-chemokine CCL15 in different tissues and cell lines was also analysed by quantitative RT-PCR (*TaqMan*[™]). The expression of CCL15 was found to be widespread, with highest values in liver. Furthermore an induction of pCC2-luc, mediated by the interleukins IL-1 β and IL-6 as well as the interferons IFN- α and IFN- γ , was observed. IL-1 β -induced promoter activation of pCC2-luc showed involvement of the mediators p38, MAPK, PKA PI3K and JAK2, whereas the IL-6 signaling pathway included only MAPK and JAK2. Also PKA influenced the IL-6-mediated promoter induction in an indirect manner. The second gene, *period*, represented by the reporter gene construct *hPER1*-luc follows a negative feedback loop which is known to be present in peripheral oscillators and therefore is activated by CLOCK/BMAL1 and inhibited by CRY. Two signaling molecules, AP-1 and C/EBP, were found to interfere with CLOCK/BMAL1-mediated *hPER1*-activation. A CLOCK/BMAL1-independent promoter activation via PKA and PKC was also detected. Here the PKA-signaling pathway showed an involvement of CREB and C/EBP whereas for PKC-signal transduction only involvement of AP-1 was detected. The significance of AP-1 and C/EBP in CLOCK/BMAL1-induced *hPer1*-expression as well as a possible involvement of PKA and PKC in the synchronization of peripheral oscillation is discussed.

Keywords: chemokines, circadian, promoter-analysis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Intrazelluläre Signalverarbeitung	1
1.1.1	Signalweiterleitung durch Tyrosin-spezifische Proteinkinasen	1
1.1.2	Signalweiterleitung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	2
1.1.3	Signalweiterleitung initiiert durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sowie durch Tyrosin-spezifische Proteinkinasen	4
1.1.4	Intrazelluläre Signalweiterleitung über die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)	6
1.2	Zytokin-induzierte intrazelluläre Signalübertragung	6
1.2.1	Die Familie der Zytokine	6
1.2.2	Die Familie der Zytokin-Rezeptoren	7
1.2.3	Klassifizierung der Zytokine	7
1.2.4	Interleukin-6 (IL-6)	7
1.2.5	Beteiligte Signalwege an der Interleukin-6-Signalübertragung	8
1.2.6	Interleukin-1 (IL-1)	9
1.2.7	Beteiligte Signalwege an der Interleukin-1-Signalübertragung	10
1.3	Chemokine	10
1.3.1	Klassifizierung der Chemokine	11
1.3.2	Bindung und Aktivierung von Chemokin-Rezeptoren	12
1.3.3	Das humane CC-Chemokin CCL15	12
1.4	Das Zusammenspiel von Zytokinen in der Leber	14
1.5	Zirkadiane Rhythmen	16
1.5.1	Molekulare Mechanismen des zirkadianen Oszillatorsystems	17
1.5.2	Molekulare Mechanismen der zirkadianen Uhr in der Maus	20
1.5.3	Zirkadiane Oszillation in peripheren Geweben	22
1.6	Ziel der Arbeit	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Laborgeräte	25
2.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	26
2.1.3	Reagenzien zur Herstellung von Lösungen für molekular- und zellbiologische Zwecke	27
2.1.4	Enzyme und Reagenziensätze	27
2.1.5	Bakterienstämme und Plasmide	28
2.1.6	Oligonukleotide	29
2.1.7	Größenstandards	30

2.2 Methoden	30
2.2.1 Sterilisierung und RNasebehandlung	30
2.2.2 Standardmethoden im Umgang mit eukaryotischen Zellen	30
2.2.3 Standardmethoden im Umgang mit Bakterien	36
2.3 Molekularbiologische Methoden	38
2.3.1 Standardmethoden zur Isolierung von Nukleinsäuren	38
2.3.2 Standardmethoden zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	40
2.3.3 Standardmethoden der Gelelektrophorese (nach Meyers et al., 1976)	41
2.3.4 Standardmethoden der Polymerasekettenreaktion (nach Saiki et al., 1988)	42
2.3.5 Standardmethoden im Umgang mit DNA und RNA	45
2.4 Proteinbiochemische Methoden	47
2.4.1 Western-Immunoblot	47
2.4.2 Radioimmunoassay (RIA)	49
2.5 Computer, Programme und Statistik	51
3 Ergebnisse	52
3.1 Signaltransduktionsanalysen zur Aktivierung des CCL15-Gens	52
3.1.1 Etablierung eines pCC-2-Luciferase-Reportergen Tests	52
3.1.2 Charakterisierung der Signaltransduktionswege bei IL-1 β - und IL-6-vermittelter pCC-2-luc Aktivierung	57
3.1.3 Analyse der endogenen CCL15-Expression nach Interleukin-Stimulation	69
3.2 Signaltransduktionsanalysen zur Aktivierung des humanen Period1-Gens (hPer1)	79
3.2.1 Untersuchungen der Induktion des humanen Period1-Gens (hPer1) in der humanen Hepatoma Zelllinie HuH-7	79
3.2.2 Molekulare Regulationsmechanismen der CLOCK/BMAL1-unabhängigen hPER1-luc-Aktivierung via PKA und PKC	84
4 Diskussion	90
4.1 Expression und Regulation des humanen CCL15-Gens	90
4.1.1 Analyse der endogenen CCL15-Genexpression	90
4.1.2 Analyse der induzierten CCL15-Genexpression	91
4.1.3 Putative Funktionen von CCL15 in Entzündungsprozessen der Leber	92
4.1.4 Klinische Relevanz des humanen CC-Chemokins CCL15	93
4.2 Charakterisierung der Signalwege in der Interleukin-vermittelten Aktivierung von CCL15	94
4.2.1 Initiierung der Signalweiterleitung über die spezifischen Zytokin-Rezeptoren IL-1RI und IL-6R	94
4.2.2 Interleukin-1 β - und Interleukin-6-induzierte intrazelluläre Signalweiterleitung	95

4.3	Etablierung eines zirkadianen peripheren Oszillatorsystems in der humanen Hepatoma Zelllinie HuH-7	105
4.4	Induktion der hPER1-Expression via PKA und PKC	106
4.4.1	Beteiligte Signalmoleküle an der CLOCK/BMAL1-induzierten hPER1-Aktivierung	107
4.4.2	Putative Signalmoleküle in der PKA-vermittelten hPER1-Aktivierung	108
4.4.3	Putative Signalmoleküle in der PKA-vermittelten hPER1-Aktivierung	109
4.4.4	Vergleichende Analyse der beteiligten Signalmoleküle in der hPER1-Aktivierung via CLOCK/BMAL1, PKA und PKC	110
5	Zusammenfassung	111
6	Literaturverzeichnis	112

ANHANG

1 Einleitung

1.1 Intrazelluläre Signalverarbeitung

Zellen eines mehrzelligen Organismus benötigen die Fähigkeit zur Kommunikation, um sich selbst sowie die eigene Entwicklung zu organisieren, auf Umwelteinflüsse zu reagieren und sich effektiv anzupassen. Durch den zellulären Prozeß einer hochregulierbaren Signalweiterleitung ist dem Organismus die Möglichkeit zur extra-, intra- und interzellulären Kommunikation gegeben. Voraussetzung einer solchen Kommunikation sind Mechanismen zur Erkennung, Verarbeitung und Weiterleitung von Signalen. Der erste Schritt liegt hierbei in der Bindung von Signalmolekülen an Rezeptoren auf der Zelloberfläche, woraus eine Aktivierung der Rezeptoren resultiert. Aktivierte Rezeptoren geben das Signal an nachgeschaltete Effektoren des Signalwegs weiter.

Es sind drei Klassen von Zelloberflächen-Rezeptoren bekannt, von denen jede die extrazellulären Signale über einen anderen Mechanismus weiterleitet. Kanal-gekoppelte Rezeptoren sind zum Beispiel Neurotransmitter-regulierte Ionenkanäle, die sich kurzzeitig nach Bindung des Neurotransmitters öffnen und somit zur zeitweiligen Änderung der elektrischen Reizbarkeit der Zelle führen (HUNTER 2000). Katalytische Rezeptoren sind im wesentlichen Tyrosin-spezifische Proteinkinasen, die Tyrosin-Reste von Zielproteinen phosphorylieren (HUNTER & COOPER 1985). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren oder inaktivieren indirekt Plasmamembran-gebundene Enzyme oder Ionenkanäle über GTP-bindende Regulatorische Proteine (G-Proteine), die sich selbst inaktivieren, indem sie ihr gebundenes GTP hydrolysieren (GILMAN 1987). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kommen rasch zum Stillstand, wenn der extrazelluläre Ligand entzogen wird.

Der letzte Schritt einer intrazellulären Weiterleitung von Signalen besteht oft in der Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, die sich in aktivierter Form an DNA-Bindungselemente anlagern und somit die Genexpression regulieren.

1.1.1 Signalweiterleitung durch Tyrosin-spezifische Proteinkinasen

1.1.1.1 Intrazelluläre Signalweiterleitung über den JAK/STAT-Signalweg

Die Janus-Kinasen (JAK-Kinasen), bestehend aus JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2, stellen eine Familie von Protein Tyrosinkinasen dar und sind in Arbeiten von DARNELL *et al.* (1994) und SCHINDLER & DARNELL (1995) umfassend beschrieben. Ein charakteristisches Merkmal der JAK-Kinasen ist das Fehlen von "src homology domain 2" (SH2)- und "src homology domain 3" (SH3)-Domänen, sowie die Existenz von zwei Tyrosinkinase-Domänen. Generell liegen die JAK-Kinasen Rezeptor-assoziiert

vor, wobei die Bindung an den cytoplasmatischen Bereich des Rezeptors vermutlich über zwei konservierte Sequenzelemente nahe der Membran, Box1 und Box2, erfolgt. Ligandenbindung führt zur Rezeptoraktivierung und resultiert in einer Umstrukturierung der intrazellulären Rezeptorregion, so daß Bindungsstellen für eine Assoziation mit der Tyrosinkinase geschaffen werden. Die Bindung der JAK-Kinasen an die intrazelluläre Rezeptorregion führt zu ihrer Aktivierung und Phosphorylierung. Die JAK-Kinasen ihrerseits katalysieren zudem die Phosphorylierung von Tyrosinresten an der cytoplasmatischen Rezeptor-Domäne. Phosphorylierte Tyrosinreste dienen als Bindungsstelle für Adapterproteine oder weitere Effektormoleküle. Ausgehend von aktivierten JAK-Kinasen kann die Signalweiterleitung direkt zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren der Familie "Signal Transducer and Activator of Transcription" (STAT) führen. Phosphorylierte STAT-Proteine bilden Homo- und/oder Heterodimere, wobei die Dimerisierung vermutlich über Phosphotyrosin-SH2-Wechselwirkungen abläuft. STAT-Dimere wandern in den Kern, binden dort an entsprechende DNA-Bindungsmotive und regulieren somit die Genexpression.

Der JAK/STAT-Weg ist ein von Zytokin-Rezeptoren ausgehender Signalweg mit nur wenigen beteiligten Kopplungselementen. Eine direkte Signalübertragung von der Membran zum Zellkern wird somit ermöglicht (DARNELL *et al.*, 1994, KISHIMOTO *et al.*, 1994, TANIGUCHI 1995). Des Weiteren ist von DARNELL & SCHINDLER (1995) beschrieben, daß die Janus-Kinasen zur Aktivierung des Ras/MAPK-Signalwegs und der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) führen können.

1.1.2 Signalweiterleitung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

1.1.2.1 Intrazelluläre Signalweiterleitung über den PKA-Signalweg

Ligandenbindung an bestimmte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kann zur Bildung des sekundären Botenstoffs cAMP führen. Hierbei wird durch Ligandenbindung die Konformation des Rezeptors verändert und die Bindungsstelle für ein stimulierendes G-Protein (G_s -Protein) freigelegt. Die Assoziation des Liganden-Rezeptorkomplexes mit einem heterotrimeren G_s -Protein resultiert in der Aktivierung des G-Proteins, und es kommt zum Austausch von GTP/GDP. Der Ersatz von GDP durch GTP läßt die α -Untereinheit des G_s -Komplexes dissoziieren und legt somit die Bindungsstelle für die Adenylat-Zyklase an der α -Untereinheit frei. Die α -Untereinheit bindet und aktiviert die Adenylat-Zyklase. Die Aktivierung wird solange aufrechterhalten, bis nach der Dissoziation des Liganden der Rezeptor in seine ursprüngliche Konformation zurückkehrt. Aktivierte Adenylat-Zyklase katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP. Im Gegenzug kann cAMP schnell durch cAMP-Phosphodiesterasen abgebaut werden, indem diese das cAMP zu 5'-Adenosin-Monophosphat (5-AMP) hydrolysieren. Das Botenmolekül cAMP seinerseits kontrolliert die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA). PKA, eine Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase, bestehend aus zwei katalytischen

C-Untereinheiten und zwei regulatorischen R-Untereinheiten, liegt in Abwesenheit von cAMP als inaktives Tetramer vor. Diese Inaktivierung beruht auf einer Autoinhibition, bei der die R-Untereinheiten über Autophosphorylierungsstellen an die Substratbindungsstellen und Teile des aktiven Zentrums der C-Untereinheit binden. Bindung von cAMP verändert die Konformation des Tetramers, resultierend in einer verringerten Affinität zwischen den R- und C-Untereinheiten. Es kommt zur Dissoziation in das Dimer der R-Untereinheiten und zwei Monomere der C-Untereinheit, die dann katalytisch aktiv werden können (NIGG *et al.*, 1985).

Aktivierte PKA kann über verschiedene Mechanismen regulatorisch auf die Genexpression einwirken. Es ist bekannt, daß cAMP-aktivierte PKA zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors "cAMP responsive element binding protein" (CREB) führen kann (KARIN & HUNTER 1995). Phosphoryliertes CREB (pCREB) bildet aktive Homodimere (MONTMINY 1990); dimeres pCREB seinerseits kann an responsive DNA-Elemente (CRE-Elemente) binden und somit differentielle Genaktivität induzieren (SHENG *et al.*, 1990). Die Proteinkinase A kann zudem den "CRE modulator" (CREM) mittels Phosphorylierung aktivieren (DE GROOT *et al.*, 1993), der identische CRE-Konsensussequenz wie dimeres pCREB erkennen kann. Weiter bestehen Hinweise darauf, daß PKA unabhängig von CREB- bzw. CRE-Elementen die Genexpression durch Heterodimerisierung mit weiteren bZIP-Proteinen regulatorisch beeinflussen kann (BENBROOK & JONES 1994). Des weiteren ist eine Induktion des Ras/MAPK-Signalwegs durch die Aktivierung der Raf-Proteine via PKA zusammenfassend von HOUSLAY & KOLCH (2000) und LIEBMANN (2001) beschrieben worden.

1.1.2.2 Intrazelluläre Signalweiterleitung über den PKC-Signalweg

Proteinkinase C bildet eine Familie von Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinasen, die sich in 12 Subtypen unterteilen lassen (DEKKER & PARKER 1994). Die Mitglieder der PKC-Familie sind einfache Polypeptide, bestehend aus einer N-terminalen regulatorischen Region (20-40 kDa) und einer C-terminalen katalytischen Region (~45 kDa) (NEWTON 1995). In Abwesenheit aktivierender Kofaktoren kommt es zu einer Autoinhibition der katalytischen Domäne durch die regulatorische Domäne (ORR & NEWTON 1994), die ein Sequenzmotiv enthält, das als Pseudosubstrat fungiert. Diese Pseudosubstrat-Sequenz ähnelt der Konsensussequenz von PKC-Phosphorylierungsstellen, besitzt jedoch keine phosphorylierbaren Serin- oder Threonin-Reste. Vermutlich wird das aktive Zentrum der katalytischen Domäne durch die Einlagerung der Pseudosubstratsequenz blockiert (AZZI *et al.*, 1992). Bei Bindung aktivierender Kofaktoren kommt es wahrscheinlich zur Stabilisierung einer Struktur der PKC, die den Zugang für Substratproteine in das aktive Zentrum ermöglicht. Es sind hierbei verschiedene Möglichkeiten für die PKC-Aktivierung bekannt, die von NEWTON 1995 zusammenfassend beschrieben wurden. Eine wesentliche Rolle spielen die sekundären Botenstoffe Ca^{2+} und Diacylglycerol, deren Freisetzung durch die Phospholipase C (PLC) induziert wird. Hierbei können zum einen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in der Aktivierung der Phospholipase C β

resultieren und somit über Ca^{2+} und Diacylglycerol die PKC induzieren. Des Weiteren ist eine PLC γ -Aktivierung durch Rezeptor-Tyrosinkinasen möglich, die zur Freisetzung von Ca^{2+} und Diacylglycerol führt und die PKC-Aktivierung vermittelt. Weitere mögliche Komponenten in der PKC-Regulation stellen die Phorbolster, Phospholipase D sowie freie Fettsäuren dar.

Die Mitglieder der PKC-Familie nehmen die Funktion zentraler Signalmoleküle in der Regulation zellulärer Prozesse ein. Aufgrund ihrer geringen Substratspezifität besitzt die PKC multiple Funktionen in zahlreichen zellulären Prozessen (NISHIZUKA 1986). NEWTON (1995) beschreibt als Beispiele für häufig detektierte Funktionen der PKC eine Beteiligung an der Rezeptor-Desensibilisierung, Modulation der Membranstruktur, Transkriptionsregulation, Vermittlung der Immunantwort sowie der Regulation des Zellwachstums.

1.1.3 Signalweiterleitung initiiert durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sowie durch Tyrosinspezifische Proteinkinasen

1.1.3.1 Die Proteinkinase-Kaskade der MAP-Kinase-Wege

Die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP)-Kinasen stellt eine Gruppe von Dual-spezifischen Serin/Tyrosin-Proteinkinasen dar, die an unzähligen physiologischen Prozessen beteiligt sind. Von JOHNSON & LAPADAT (2002) wurde den MAP-Kinasen eine Beteiligung an der Regulation von Genexpression, Mitose, Zellwanderung, Metabolismus und Apoptose zugeschrieben.

Die MAPK-Familie besteht aus den drei Subfamilien "p42/44 MAPK/extrazellulär regulierte Kinase" (ERK), "Jun amino-terminal kinases/stress-activated kinases" (JNKs/SAPKs) und p38. Die Signalkaskade des MAP-Kinase-Wegs umfaßt mindestens drei hintereinander geschaltete Proteinkinasen. Die Aktivierung der MAP-Kinase-Signalkaskaden ist durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli induzierbar. Als den MAP-Kinasen vorgeschaltete Signalproteine sind die Ras-Proteine identifiziert worden, die zur Ras-Superfamilie der monomeren GTPasen zählen. Hierbei handelt es sich um regulatorische GTPasen einer Größe von 16-25 kDa. Ras-Proteine nehmen die Funktion einer zentralen Schaltstation von Signalwegen ein. Aktivierung von Ras-Proteinen kann über Rezeptor-Tyrosinkinasen, Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinasen oder durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren induziert werden. Bis zum Ras-Protein erfolgt die Signalweiterleitung weitgehend membrangebunden. Anschließend verläuft die Signalweiterleitung von der Membran ausgehend über eine Kaskade hintereinander geschalteter MAP-Kinasen bis ins Zellinnere. Hierbei kommt es durch aktivierte Ras-Proteine zur Aktivierung einer Gruppe von Serin/Threonin-Kinasen, den MAPKK-Kinasen. Diese phosphorylieren die nachgeschalteten MAPK-Kinasen, die ihrerseits die nächste Gruppe der MAP-Kinasen an einem Tyrosin- und Threonin-Rest phosphorylieren. Es wird davon ausgegangen, daß die verschiedenen Wege auf jeder Stufe regulierbar, untereinander vernetzt und auch durch andere Signalwege beeinflussbar sind. Die Substrate der MAP-Kinase-Wege sind vielfältig und umfassen eine Reihe

verschiedener Transkriptionsfaktoren, die an der Aktivierung der Genexpression beteiligt sind. Dieselben Substrate können durch verschiedene MAPK-Wege induziert werden. Es wird deutlich, daß es sich bei den Ras/MAP-Kinase-Wegen um ein sehr flexibles und komplexes System handelt.

1.1.3.1.1 Intrazelluläre Signalweiterleitung über den Ras/MAPK-Signalweg

Der auch als "klassische cytoplasmatische Signalkaskade" bekannte Signalweg ist der am besten untersuchte Weg und führt zur Aktivierung von Mitgliedern der "p42/44 MAPK/extrazellulär regulierten Kinase" (ERK). Diese wird nachfolgend nur noch als MAPK bezeichnet. Der MAPK-Signalweg kann über verschiedene Stimuli aktiviert werden, hauptsächlich von Wachstumsfaktoren, Hormonen oder Zytokinen (GARRINGTON & JOHNSON 1999). In der Publikation von JOHNSON & LAPADAT (2002) wird den beteiligten MAP-Kinasen eine regulatorische Funktion in der Meiose und Mitose zugeschrieben, sowie eine Beteiligung in postmitotischen Funktionen differenzierter Zellen. Die Initiierung des MAPK-Signalwegs beginnt mit der Bindung extrazellulärer Signalmoleküle an Rezeptor-Tyrosinkinasen, resultierend in einer Aktivierung von Ras-Proteinen. Ras in aktiver Form mediiert die Aktivierung der MAPKK-Kinasen der Raf-Familie. Aktivierte Raf-Kinasen ihrerseits induzieren die MAPK-Kinasen MEK1 und MEK2 durch Phosphorylierung von zwei Serinresten an der katalytischen Domäne der MAPKK. Aktivierte MEK ist eine dualspezifische Kinase, die Signale durch Serin/Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung an die nukleären MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 weiterleitet. Die cytoplasmatischen und nukleären Substrate, die für den MAPK-Signalweg beschrieben sind, sind vielfältig und umfassen neben Proteinkinasen auch eine Reihe Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel c-Jun, STATs, c-Myc, Elk-1 oder C/EBP (GARRINGTON & JOHNSON 1999).

1.1.3.1.2 Intrazelluläre Signalweiterleitung über den p38-Signalweg

Zelluläre Reaktionen auf Streßeinwirkung wie zum Beispiel durch UV-Licht, osmotischen Schock oder inflammatorische Zytokine werden hauptsächlich über die Signalweiterleitung via SAPK/JNK- oder p38-Signalkaskaden vermittelt. Eine Beteiligung der p38-Signalkaskade ist bisher für zelluläre Prozesse wie Inflammation, Zellwachstum und Zelldifferenzierung sowie ein Mitwirken an Zellzyklus und Apoptose beschrieben (ONO & HAN 2000). ZHANG *et al.* und BAGRODIA *et al.* zeigten 1995, daß der p38-Signalweg primär durch Rac und Cdc42, Mitglieder der Rho Familie kleiner regulatorischer GTPasen, vermittelt wird. Über eine Kaskade hintereinander geschalteter MAPKKK (MLK-4, TAK-1, ASK-1, MTK-1) und MAPKK (MKK3, MKK6) kommt es zur Aktivierung der MAPK p38 (HOUSLAY & KOLCH 2000).

Die Untergruppe der p38-Kinasen besteht aus den vier Mitgliedern α , β , γ und δ . Ausgehend von p38 kommt es zu einer Diversifizierung und umfassenden Verzweigung der Signalwege, bei der sowohl Proteinkinasen als auch Transkriptionsfaktoren involviert sind. Als p38-responsive

Transkriptionsfaktoren wurden von SHI & GAESTEL 2002 unter anderem Mitglieder der C/EBP-Familie (p53, STAT1, NFAT) aufgeführt.

1.1.4 Intrazelluläre Signalweiterleitung über die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)

Die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) ist eine Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase, die verschiedene Phosphatidylinosit-Verbindungen an der 3'-Position phosphoryliert. PI3K weist einen heterodimeren Aufbau auf, bestehend aus einer katalytischen Untereinheit von 110 kDa (p110) und einer regulatorischen Untereinheit von 85 kDa (p85). Die regulatorische Untereinheit p85 weist eine SH3-Domäne, zwei SH2-Domänen sowie zwei Prolin-reiche Bereiche auf, die als Bindungsmodule dienen. FRUMAN & CANTLEY (2002) beschreiben, daß eine Aktivierung der PI3Kinase durch Antigene, Zytokine, Immunglobuline und Chemokine erreicht werden kann. Aktivierte PI3K kann durch die 3'-Phosphorylierung von PtdIns (4,5)₂ zu Bildung von PtdIns (3,4,5) P₃ führen. In der Signalweiterleitung werden phosphorylierte Lipide an der Zellmembran gebildet und tragen ihrerseits zur Rekrutierung und Aktivierung verschiedener Signalkomponenten bei; PtdIns (3,4,5) P₃ nimmt eine bedeutende Funktion als intrazellulärer Botenstoff ein (CANTLEY 2002).

PI3K-medierte Signalweiterleitung kann zur Aktivierung verschiedenster Signalmoleküle führen und somit in zahlreichen Signalwegen regulierend einwirken. Es ist eine Interaktion mit dem Ras-Protein (p21^{ras}) beschrieben (RODRIGUEZ-VICIANA *et al.*, 1994, HU *et al.*, 1995) sowie die Aktivierung bestimmter Proteinkinasen (TOKER *et al.*, 1994, FRANKE *et al.*, 1995, AKIMOTO *et al.*, 1996, KLIPPEL *et al.*, 1996). REDDY *et al.* zeigten 1997 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors "Activator Protein-1" (AP-1) durch PI3K.

1.2 Zytokin-induzierte intrazelluläre Signalübertragung

1.2.1 Die Familie der Zytokine

Zytokine sind von verschiedenen Zelltypen gebildete, humorale Botenstoffe mit lokaler oder systemischer Signalwirkung. Sie vermitteln die Zell-Zell-Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen des Immunsystems, nehmen aber auch eine zentrale Funktion im Wachstum sowie der Differenzierung, Entwicklung und Hämatopoese ein (KISHIMOTO *et al.*, 1994). Das charakteristische Merkmal der Zytokine ist ihre funktionelle Pleiotropie und Redundanz. Zytokine wirken auf eine Vielzahl verschiedener Zellen in unterschiedlicher Weise; ein bestimmter biologischer Effekt ist jedoch oft durch mehr als ein Zytokin mediiert. Die Redundanz und Pleiotropie sind durch den molekularen Aufbau des Zytokin-Rezeptorsystems inzwischen gut charakterisiert (KISHIMOTO *et al.*, 1994).

1.2.2 Die Familie der Zytokin-Rezeptoren

Aufgrund ihrer Sequenzhomologien lassen sich die Zytokin-Rezeptoren in mindestens vier Unterklassen einteilen, Typ I-IV (BAZAN 1990, TANIGUCHI 1995). Spezifisch für den einzelnen Rezeptor-Typ, weisen die Zytokin-Rezeptoren im extrazellulären Bereich charakteristische Sequenzabschnitte auf. Hierbei kann es sich um Cysteinreiche Domänen, Fibronectin-Typ III-ähnliche Domänen oder Immunglobulin-ähnliche Domänen handeln; Typ I Rezeptoren weisen oft ein konserviertes WSXWS-Motiv in ihrer extrazellulären Region auf. Der Aufbau der Rezeptor-untereinheiten ist sehr variabel. Es gibt Rezeptoren, die nur aus einer Peptidkette bestehen, andere zeigen eine heterooligomere Struktur, aufgebaut aus mehreren Polypeptidketten. Die meisten Zytokin-Rezeptoren wirken nur als Multiprotein-Komplex, das heißt, eine Polypeptidkette wird für die Ligandenbindung verwendet, eine zweite Polypeptidkette dient der Weitergabe des Signals ins Zellinnere (MIYAJIMA *et al.*, 1992, TANIGUCHI 1995). Kennzeichnend für heterooligomere Rezeptoren ist die Möglichkeit verschiedener Rezeptoren dieselbe signalweiterleitende Polypeptidkette zu nutzen. Hierdurch ist auch die redundante und pleiotrope Wirkung erklärbar.

Ligandenbindung resultiert in Rezeptoraktivierung, indem es zu einer Oligomerisierung der beteiligten Untereinheiten kommt, die in der Aktivierung einer Tyrosinkinase resultiert. Für den intrazellulären Bereich der signalweiterleitenden Polypeptidkette konnte bisher noch keine endogene Protein Tyrosinkinase (PTK)-Aktivität nachgewiesen werden. Zytokin-Rezeptoren nutzen deshalb intrazelluläre Tyrosinkinasen, die frei im Cytoplasma lokalisiert sind oder Rezeptor-assoziiert vorliegen (ARAI *et al.*, 1990, AURON 1998, DINARELLO 1996, HIRANO 1998).

1.2.3 Klassifizierung der Zytokine

Zytokine wurden aufgrund ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften zu einer gemeinsamen Gruppe zusammengefaßt. Durch die zunehmende Identifizierung neuer Zytokine entstand eine Gruppe von Peptiden, die umfangreiche strukturelle und funktionelle Unterschiede aufwiesen. Aufgrund dessen wurde 1995 von LILES & VAN VOORHIS eine Klassifizierung vorgenommen, die zwischen Hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, Interferonen, Lymphokinen, Monokinen, Chemokinen und schwer klassifizierbaren Zytokinen unterscheidet.

1.2.4 Interleukin-6 (IL-6)

Das Interleukin IL-6 (21-28 kDa) zählt zur Gruppe der Lymphokine und ist ein multifunktionelles Zytokin, das mit LIF, CNTF, Oncostatin M, IL-11 und CT-1 zu der IL-6 Zytokinfamilie zusammengefaßt wird. IL-6 wird von einer Vielzahl von Zellen nach deren Aktivierung synthetisiert, wozu

Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und KM-Stromazellen zählen. Die Aktivierung dieser Zellen kann durch verschiedene Stimuli wie zum Beispiel virale Infektionen, bakterielle Endotoxine, Zytokine oder Wachstumshormone hervorgerufen werden (ARAI *et al.*, 1990, HIRANO 1998). Als Zielzellen von IL-6 sind T- und B-Lymphozyten, Plasmazellen, Hepatozyten und KM-Zellen beschrieben (HORN 2000).

IL-6 ist primär an der Immunantwort sowie der akuten und chronischen Inflammation beteiligt (ARAI *et al.*, 1990) und kann in endokriner, parakriner und autokriner Weise wirken, so daß lokale und systemische Effekte möglich sind (HORN 2000). Weitere Funktionen umfassen die Regulation der Differenzierung und Proliferation von T- und B-Lymphozyten (HORN 2000), die Hämatopoese, die Kontrolle des Knochenmetabolismus sowie die Regeneration der Leber (CRESSMAN *et al.*, 1996).

Der IL-6 Rezeptor (IL-6R) zählt zu den Typ I Rezeptoren der Zytokin-Rezeptoren (DAVIS *et al.*, 1991) und wird auf T-Zellen, Mitogen-aktivierten B-Zellen, peripheren Monozyten und einigen Tumorzelltypen exprimiert. IL-6R ist ein 449 Aminosäure langes 80 kDa Protein und daher oft auch als gp80 bezeichnet. Die molekulare Struktur des Rezeptors ist durch den Besitz einer Immunglobulin-ähnlichen Region in der extrazellulären Domäne gekennzeichnet. IL-6R formt einen multimeren Rezeptorkomplex mit dem Transmembranprotein gp130, das für die intrazelluläre Signalweiterleitung verantwortlich ist (HIBI *et al.*, 1990, TAGA *et al.*, 1989). Die Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor resultiert in einer Disulfid-gekoppelten Homodimerisierung von gp130, begleitet von der Assoziation und Aktivierung einer intrazellulären Tyrosinkinase. Es wurde gezeigt, daß gp130 auch von anderen Rezeptoren genutzt werden kann. Hierzu zählen "leukemia inhibitory factor" (LIF), "ciliary neurotrophic factor" (CNTF), "oncostatin M" (OSM), IL-11 und "cardiotrophin-1" (CT-1). Dies erklärt, warum LIF, CNTF und IL-6 einige gemeinsame biologische Effekte besitzen, obwohl die Faktoren an sich nicht miteinander verwandt sind.

1.2.5 Beteiligte Signalwege an der Interleukin-6-Signalübertragung

Die IL-6-Signalweiterleitung wird im wesentlichen über zwei Hauptwege vermittelt. Hierbei ist der JAK/STAT-Weg als einer der Hauptsignalwege von GERHARTZ *et al.* (1996) und HEINRICH *et al.* (1998) beschrieben worden. Hierbei konnten JAK1, JAK2 und TYK2 als IL-6-responsive Tyrosinkinasen ermittelt werden (LUTTIKEN *et al.*, 1993, STAHL *et al.*, 1993), die primär in der Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 resultieren (ZHONG *et al.*, 1994).

Als zweite wesentliche Signalwege in der IL-6-Signalweiterleitung wurden die "Mitogen-aktivierten Proteinkinase" (MAPK)-Signalwege nachgewiesen. Hierbei wurde in Untersuchungen von BOULTON *et al.* (1994) und FUKADA *et al.* (1996) eine Beteiligung der MAPK gezeigt. XU *et al.* beschreiben 1998 die Beteiligung des JNK/SAPK-Wegs, ZAUBERMAN *et al.* (1999) konnten in der humanen Hepatoma Zelllinie HepG2 p38 als IL-6-responsive Kinase identifizieren.

1.2.6 Interleukin-1 (IL-1)

Interleukin-1 (IL-1), ein klassisches multifunktionelles proinflammatorisches Zytokin, zählt zu den Monokinen. Die IL-1-Familie besteht aus den drei Mitgliedern IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra (AURON *et al.*, 1984, LOMEDICO *et al.*, 1984, AREND 1993). Hierbei stellt IL1Ra den natürlich vorkommenden Rezeptorantagonisten dar, der zur Blockade des IL-1-Rezeptor fähig ist (AREND 1993).

Interleukin-1 wird von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen wie Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, Dendritischen Zellen, Astrozyten, Natürlichen Killer Zellen (NK), Endothelzellen und Fibroblasten nach deren Aktivierung sezerniert (ARAI *et al.*, 1990). Die Synthese von IL-1 kann durch eine Vielzahl von Stimuli ausgelöst werden, wie zum Beispiel nach Infektionen, durch Endotoxine oder Zytokine (DINARELLO 1991).

Die Zielzellen von IL-1 sind zahlreich und umfassen im wesentlichen T- und B-Lymphozyten, Hepatozyten und Knochenzellen. Basierend auf überlappenden Effekten und einem ähnlichen Produktionsmuster kann IL-1 mit TNF- α und IL-6 in einer Gruppe zusammengefaßt werden (ARAI *et al.*, 1990, AURON 1998). Die zentrale Rolle von IL-1 liegt in der Immunreaktion sowie in akuten und chronischen Entzündungsprozessen und kann, wie IL-6, sowohl lokale als auch systemische Wirkungen initiieren. Es konnte gezeigt werden, daß IL-1 eine Wirkung auf die Proliferation von T- und B-Zellen hat (GERY *et al.*, 1972, HOWARD *et al.*, 1983), sowie auf die Thymozytenreifung (DELUCA & MIZEL 1986), die T-Zellaktivierung (FARRA *et al.*, 1980) und die Synthese und Oberflächenexpression von Immunglobulinen (GIRI *et al.*, 1984). Des weiteren ist, wie 1988 von DINARELLO beschrieben, ein fördernder Einfluß auf Fieber, hepatische Akut-Phase-Reaktion, Tumorstadium und Metastasierung, Angiogenese, Proliferation von Fibroblasten und Muskelzellen sowie auf die HIV-1-Genexpression nachweisbar.

Für den IL-1 Rezeptor, der zum Zytokin-Rezeptor Typ IV zählt, sind zwei Formen beschrieben, IL-1RI und IL-1RII (SIMS und DOWER 1994). Eine lösliche Form von IL-1RII ist ebenfalls bekannt (KORHERR *et al.*, 1997). Der 80 kDa schwere IL-1RI ist fast auf allen Zelltypen exprimiert, wohingegen der 68 kDa IL-1RII hauptsächlich auf B-Zellen und Neutrophilen detektiert wurde (SIMS und DOWER 1994). Beide Rezeptoren besitzen drei extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domänen, in denen die Bindungsstelle für IL-1 lokalisiert ist. Es wurde festgestellt, daß die IL-1-Signalweiterleitung über IL-1RI induziert wird, IL-1RII hingegen ist nicht notwendig und scheint als Inhibitor der IL-1 Antwort zu agieren (COLOTTA *et al.*, 1993, COLOTTA *et al.*, 1994). GREENFEDER *et al.* konnten 1995 das "IL-1 Receptor accessory protein" (IL-1RAcP) nachweisen. In Publikationen von KORHERR *et al.* konnte 1997 gezeigt werden, daß drei Komponenten für die IL-1-Signalweiterleitung notwendig sind, IL-1RI, IL-1RAcP und IL-1 α bzw. IL-1 β als Liganden. Hierbei führt die Bindung von IL-1 an IL-1RI zur Assoziation mit IL-1RAcP und initiiert die IL-1-Signalweiterleitung.

1.2.7 *Beteiligte Signalwege an der Interleukin-1-Signalübertragung*

Der IL-1-Signalweg gestaltet sich weitaus komplexer als der IL-6-Signalweg, zudem sind die intrazellulären Abläufe noch weitgehend ungeklärt. CROSTON *et al.* (1995) und CAO *et al.* (1996) identifizierten die Serin/Threonin-Proteinkinase "IL-1 receptor-associated kinase" (IRAK), die nach Rezeptoraktivierung mit IL-1RI assoziiert und anschließend phosphoryliert wird. 1996 wurde TRAF6 als ein neues Mitglied der TRAF-Familie von CAO *et al.* beschrieben, dem die Funktion eines Signalumwandlers zugesprochen wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß TRAF6 die NF κ B-Aktivierung via IL-1 mediiert. In Arbeiten von AURON (1998) wurde ein zusätzlicher Mechanismus detektiert, der zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B führen kann. Hierbei wurde eine IL-1-vermittelte Rekrutierung und Aktivierung der PI3-Kinase an IL-1RI gezeigt, die IRAK-unabhängig ist und in einer Induktion von NF κ B resultiert. Untersuchungen von REDDY *et al.*, 1997 zeigten ebenfalls, daß PI3K als Signalumwandler in der IL-1-Signalweiterleitung fungiert und über verschiedene Mechanismen die Aktivierung von NF κ B und AP-1 steuert. Als weiteres putatives Signalmolekül, das am IL-1-Signaltransfer beteiligt ist und zur NF κ B-Aktivierung führen kann, wurde das Protein MyD88 identifiziert (MUZIO *et al.*, 1997).

Das "IL-1 receptor interacting protein" (IIP1) wurde von SIMS *et al.* (1999) als ein IL-1-Rezeptor interagierendes Protein detektiert. Es besitzt eine "GTPase activating protein" (GAP)-ähnliche Domäne, woraus die Annahme einer Beteiligung von G-Proteinen an der IL-1-Signalübertragung resultiert. Aufgrund gemessener GTPase-Aktivität in Membranfraktionen IL-1-stimulierter Zellen vermuteten O'NEILL *et al.* bereits 1989 eine Kopplung des IL-1-Rezeptors an ein G-Protein. Die Annahme wurde bestärkt durch Untersuchungen von SHIRAKAWA *et al.* (1988) und CHEDID *et al.* (1989), die durch die Gabe von IL-1 eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration erzielten. Im Jahr 1990 wurde in den Arbeiten von CHEDID & MIZEL (1990) und O'NEILL *et al.* (1990) der Nachweis erbracht, daß der IL-1-Rezeptor an ein G-Protein gekoppelt ist, das seinerseits die Adenylat-Zyklase aktiviert und somit zur Phosphorylierung und Aktivierung der PKA führt.

Weitere IL-1-responsive Signalwege umfassen Signalkaskaden der MAP-Kinase Familie. Es wurden MAPK (WILMER *et al.*, 1997), JNK (WILMER *et al.*, 1997, WHITMARSH *et al.*, 1997) und p38 (WHITMARSH *et al.*, 1997, O'NEILL & GREENE 1998) nachgewiesen. AURON beschreibt 1998 die Rekrutierung und Phosphorylierung der PI3-Kinase an die Liganden-bindende Polypeptidkette IL-1RI.

1.3 *Chemokine*

Eine weitere Gruppe der Zytokine sind die Chemokine, kleine chemotaktisch wirksame Proteine, die für die Rekrutierung von Immunzellen verantwortlich sind (LUSTER 1998, ZLOTNIK & YOSHIE 2000, MACKAY 2001). Den Chemokinen wird eine wesentliche Rolle in der Immun- und Entzündungsreaktion zugeschrieben. Zunehmend werden weitere Prozesse detektiert, in denen Chemokine

involviert sind, wie zum Beispiel Angiogenese, Hämatopoese und Mitogenese (KUNDEL 1999). Aufgrund funktioneller Unterschiede befürwortet BAGGIOLINI (2000) eine Einteilung in inflammatorische und homoeostatische ("homing") Chemokine. Chemokine können konstitutiv exprimiert werden oder weisen eine induzierbare Genexpression auf. LUSTER beschreibt 1998, daß fast alle Zelltypen unter bestimmten Bedingungen zur Chemokin-Synthese befähigt sind. BAGGIOLINI *et al.* konnten bereits 1994 zeigen, daß frühe proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α , bakterielle Produkte wie LPS oder virale Infektionen in einer Produktion von Chemokinen resultieren.

1.3.1 Klassifizierung der Chemokine

Chemokine sind kleine 8-10 kDa Proteine, die untereinander eine Sequenzhomologie von 20-70% aufweisen. Aufgrund der relativen Positionierung von vier konservierten Cysteinen am NH₂-Terminus werden die Chemokine in die vier Untergruppen der CC-, CXC-, C- und CX3C-Chemokine eingeteilt. Bei CC-Chemokinen sind die ersten zwei Cysteine direkt nebeneinander lokalisiert. Sie weisen ein breites Wirkungsspektrum auf und zeigen chemotaktische Effekte auf Monozyten, Eosinophilen, Basophilen und Lymphozyten (LUSTER 1998) sowie auf T-Zellen, Dendritische Zellen und Natürlichen Killerzellen (MANTOVANI 1999), im allgemeinen jedoch nicht auf Neutrophile (LUSTER 1998, MANTOVANI 1999).

Die Untergruppe der CXC-Chemokine besitzt zwei konservierte Cysteine, die durch eine nicht konservierte Aminosäure ("X") getrennt sind. In der Regel wirken CXC-Chemokine primär auf Neutrophile und Lymphozyten (LUSTER 1998, MANTOVANI 1999, ZLOTNIK & YOSHIE 2000). Es wurde jedoch noch eine weitere Unterteilung, basierend auf dem tripeptidischen Motif "Glutaminsäure-Leucin-Arginin" (ELR) durchgeführt. Hierbei wirken ELR-positive CXC-Chemokine spezifisch auf myeloide Zellen, wohingegen ELR-negative CXC-Chemokine die Rekrutierung einer Vielzahl von Leukozyten steuern (OLSON & LEY 2002).

C-Chemokine weisen nur ein einziges Cystein auf und bestehen bis dato nur aus einem Mitglied, dem Lymphotaktin. Für Lymphotaktin ist eine chemotaktische Wirkung auf T-Lymphozyten und NK-Zellen beschrieben worden (SOZZANI *et al.*, 1998).

Bei der Untergruppe der CX3C-Chemokine sind die ersten beiden Cysteine durch drei nicht konservierte Aminosäuren ("XXX") voneinander getrennt. Auch hier existiert zur Zeit nur ein einziges Mitglied, das Fraktalkin. Fraktalkin wirkt auf T-Lymphozyten, NK-Zellen und Monozyten (SOZZANI *et al.*, 1998).

1.3.2 Bindung und Aktivierung von Chemokin-Rezeptoren

Chemokine induzieren Zellmigration und Zellaktivierung über die Bindung an G-Protein-gekoppelte Oberflächenrezeptoren der Zielzellen (MURPHY 1994, PREMACK & SCHALL 1996). Chemokin-Rezeptoren sind Sieben Transmembran-Rezeptoren und werden hauptsächlich in CC-Rezeptoren (CCR) und CXC-Rezeptoren (CXCR) eingeteilt. Sie können generell mehr als ein bestimmtes Chemokin binden, wobei von LODI *et al.* (1994) beschrieben ist, daß CC-Rezeptoren (CCR) nur CC-Chemokine und CXC-Rezeptoren (CXCR) nur CXC-Chemokine binden. Nach Ligandenbindung kommt es zum Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration und der Aktivierung verschiedener Phospholipasen (C, D und A2) (MANTOVANI & SOZZANI 2000). Die Phospholipasen wiederum sind verantwortlich für die geregelte Freisetzung von zellulären Effektoren und sekundären Botenstoffen. Chemokin-Rezeptoren können in einigen Zellen konstitutiv exprimiert werden, wohingegen sie in anderen Zellpopulationen induzierbar sind. Das Expressionsmuster ist ein wesentlicher Faktor, der die Selektivität der Chemokine bestimmt und die Expressionsregulation stellt somit einen alternativen Mechanismus dar, die Stärke und Spezifität der Leukozyten-Rekrutierung zu steuern (SOZZANI *et al.*, 1998).

1.3.3 Das humane CC-Chemokin CCL15

Im Jahr 1996 wurde von SCHULZ-KNAPPE *et al.* das CC-Chemokin CCL14a (früher HCC-1) aus humanem Hämofiltrat isoliert. In genomischen Analysen der stromabwärts gelegenen DNA-Sequenz des CCL14a-Gens, die im Rahmen der Dissertation von PARDIGOL 1996 durchgeführt wurden, kam es zur Identifizierung des CCL15-Gens (früher HCC-2, synonym Leukotaktin-1 und MIP-5). Das humane CCL15 ist wie CCL14a der Untergruppe der CC-Chemokine zuzuordnen. Eine Isolierung des natürlich vorkommenden CCL15-Peptids war bisher nicht möglich. Die Aminosäuresequenz wurde entweder hergeleitet aus Sequenzinformationen eines "expressed sequence tag" (EST)-Klons (COULIN *et al.*, 1997) oder durch molekulare Klonierungsstrategien (YOUN *et al.*, 1997, WANG *et al.*, 1998) sowie aus der bizistronischen CCL14a-CCL15 mRNA abgeleitet (PARDIGOL *et al.*, 1998). CCL15 zeigt das typische CC-Motiv, enthält jedoch im Vergleich zu den anderen CC-Chemokinen zwei zusätzliche Cystein-Reste, die eine dritte Disulfidbrücke bilden. Bisher konnten drei molekulare Formen von CCL15 mit unterschiedlicher aminoterminaler Länge detektiert werden (1-92, 25-92 und 27-92), der Aminoterminus von natürlichem CCL15 konnte jedoch bislang nicht bestimmt werden. Da die Länge der aminoterminalen Region jedoch ein entscheidendes Kriterium für die Aktivität der Chemokine darstellt, wäre eine Isolierung von natürlichem CCL15 enorm wichtig für die Bestimmung seiner biologischen Aktivität.

Die Gene von CCL14a und CCL15 sind, wie die meisten bekannten CC-Chemokine, auf dem Chromosom 17q11-q21 lokalisiert (BAGGIOLINI *et al.*, 1994, PARDIGOL *et al.*, 1998). Hierbei ist das

Gen von CCL15 in einer Kopf-zu-Schwanz-Orientierung stromaufwärts benachbart des CCL14a-Gens gelegen. Das CCL14a-Gen weist, wie humane CC-Chemokine generell, eine typische Organisation aus drei Exons und zwei Introns auf. Das CCL15-Gen hingegen ist aus vier Exons und drei Introns aufgebaut, wobei die zur Disulfidbindung notwendigen Cysteine auf Exon 3 und 4 liegen. Bisherige Untersuchungen des CCL15-Gens lassen noch keine Rückschlüsse zu, ob Exon 2 Teile des Signalpeptids enthält, oder nur Regionen des Propeptids kodiert. YOUN *et al.* konnten 1998 auf Chromosom 17q11-2 ein weiteres Gen nachweisen, CCL23 (MPIF-1), das nahe von CCL15 lokalisiert ist. Sequenzvergleiche ergaben eine Sequenzhomologie von 68% zwischen CCL15 und CCL23, woraus die Annahme resultiert, daß eines der beiden Gene durch eine Genduplikation entstanden sein könnte. CCL23 weist ebenfalls eine dritte Disulfidbrücke auf und ähnelt CCL15 auch in seinem genetischen Aufbau (YOUN *et al.*, 1998). Als murine Orthologe von CCL15 und CCL23 wurden CCL6 sowie CCL9 und 10 identifiziert (FORSSMANN *et al.*, 2002).

Die gewebespezifische Verteilung monozistronischer mRNA von CCL14a und CCL15 zeigt beträchtliche Unterschiede. Das CCL14 Gen ist konstitutiv in zahlreichen Geweben wie Milz, Herz, Skelettmuskel, Lunge, Leber, Darm, Thymus, Prostata, Eierstöcken, Hoden und Pankreas exprimiert (SCHULZ-KNAPPE *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu ist CCL15-Expression nur in Leber, Darm, Lungenleukozyten, Herz, Skelettmuskel und der Nebenniere nachweisbar (COULIN *et al.*, 1997, PARDIGOL *et al.*, 1998, YOUN *et al.*, 1998).

In Untersuchungen über die Rezeptorbindung von CCL15 konnten PARDIGOL *et al.* 1998 zeigen, daß CCL15 primär an CCR1 und nur in geringem Maß an CCR3 bindet. CCL15 kann in verschiedenen Leukozytenpopulationen Chemotaxis auslösen. So beschreiben COULIN *et al.* (1997), SOZZANI *et al.* (1997) und PARDIGOL *et al.* (1998) die Rekrutierung von Monozyten, Eosinophilen, Dendritischen Zellen und Lymphozyten, YOUN *et al.* (1997) wies zudem Chemotaxis bei Neutrophilen nach. Für das humane CCL14a konnte 2002 von FORSSMANN *et al.* gezeigt werden, daß CCR1 und CCR5 die prinzipiellen Rezeptoren für CCL14a (1-74) darstellen. CCL14a (1-74) wirkt chemotaktisch auf Monozyten, Eosinophile und T-Lymphozyten (FORSSMANN *et al.*, 2002).

Bisherige Untersuchungen bezüglich der biologischen Funktion von CCL14a und CCL15 haben gezeigt, daß beide humanen CC-Chemokine modulierend auf die Proliferation von Stammzellen und myeloiden Progenitorzellen einwirken können (FORSSMANN *et al.*, 2002). SCHULZ-KNAPPE *et al.* konnten 1996 nachweisen, daß CCL14a (1-74) die Proliferation von CD34 (+) Knochenmarkszellen in der Gegenwart des Stammzellularfaktors verstärkt. In der Arbeit von DETHEUX *et al.* (2000) wurden anti-HIV Eigenschaften der natürlich prozessierten Form von CCL14a ermittelt. Aus Untersuchungen von FORSSMANN *et al.* (2002) resultiert die Annahme CCL14a (1-74) könnte einen Faktor repräsentieren, der für Homeostase von CCR1 (+) inflammatorischen Zellen im Blut verantwortlich ist. Für CCL15 (1-92) konnte im Gegensatz zu CCL14a eine suppressive Wirkung auf humane unreife myeloide Progenitorzellen gezeigt werden, die auch für CCL23 zu beobachten ist (YOUN *et al.*, 1997). CCL15 wird von FORSSMANN *et al.* (2002) als ein klassisches inflammatorisches Chemokin

beschrieben, das zur Rekrutierung fast aller inflammatorischer Zellen fähig ist, insbesondere von Leukozyten der angeborenen Immunantwort.

1.4 Das Zusammenspiel von Zytokinen in der Leber

Die Leber ist ein zentrales Organ metabolischer Prozesse. Zu ihren Funktionen zählen unter anderem die Gallenbereitung und -ausscheidung, die Regulation des Eiweiß-, Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels, die Speicherung von Glykogen sowie die Entgiftung des Körpers (KNOLLE & GERKEN 2000). Die Leber ist gekennzeichnet durch ihren heterogenen Aufbau aus verschiedenen Zellpopulationen, zu denen Hepatozyten, Kupffer Zellen, Endothelzellen "liver sinusoidal endothelial cells" (LSEC) und Sternzellen "hepatic stellate cells" (HSC) zu zählen sind. Sowohl Hepatozyten als auch die nicht-parenchymalen Zellen sind zur Synthese verschiedener Zytokine und Chemokine fähig. Diese können parakrin Hepatozyten und andere nicht-parenchymalen Zellen beeinflussen oder systemisch in anderen Organen des Körpers wirken (RAMADORI & ARMBRUST 2001).

Eine wesentliche Funktion der Leber wird von der ansässigen Makrophagenpopulation der Leber, den Kupffer Zellen, eingenommen. Sie sind verantwortlich für die Eliminierung von Antigenen oder Pathogenen, die durch das portale-venöse Blut in die Leber gelangen (KNOLLE & GERKEN 2000). Parenchymale Hepatozyten stellen mit ca. 70% den Großteil der Leberzellen und können nach Aktivierung Akut-Phase-Proteine sezernieren. Sie sind in gefalteten Lagen angeordnet, die in blutgefüllte Räume, den Sinusoiden münden. Eine dünne Schicht aus Endothelzellen ("liver sinusoidal endothelial cells" (LSEC)) und vereinzelt Kupffer Zellen trennt die Hepatozyten von der Blutbahn. Kleine Löcher in der Endothelschicht ermöglichen den Austausch von Molekülen und kleinen Partikeln zwischen Hepatozyten und Blutbahn, ohne die Hepatozyten zur Nahrungsaufnahme dem direkten Kontakt mit den zirkulierenden Blutzellen auszusetzen. Als dritte Zellpopulation sind die hepatischen Sternzellen (HSC) zu nennen. Hepatische Sternzellen (HSC) sind für die Zellregeneration der Leber von wesentlicher Bedeutung und sind damit verbunden verantwortlich für Bildung extrazellulärer Matrix und der Fibrogenese (BONE-LARSON *et al.*, 2000, MARRA 2002).

Die Leber nimmt eine zentrale Funktion im Ablauf der Akut-Phase-Reaktion ein, in deren Verlauf es primär zur Infiltration von Neutrophilen in das Gewebe kommt (Beteiligung von CXC-Chemokinen). Diese wird primär durch die Aktivierung von Kupffer Zellen ausgelöst, die infolgedessen Zytokine und Chemokine synthetisieren. DECKER beschrieb 1990 für Kupffer Zellen eine Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, TNF- α und Chemokinen nach Phagozytose oder Bindung aktivierender Komponenten. Die sezernierten Chemokine sind hierbei verantwortlich für die Rekrutierung von Leukozyten, hauptsächlich Neutrophilen (RAMADORI & ARMBRUST 2001). Die Abbauprodukte aktivierter Neutrophile haben auf die Hepatozyten eine toxische Wirkung, führen zu hepatischer Nekrose und sind somit wesentlich an der Leberschädigung beteiligt (HOLMAN & SABA 1988, MALMROS *et al.*, 1994). Die sekretierten Zytokine der Kupffer Zellen sind für die Aktivierung

der Hepatozyten verantwortlich. DINARELLO (1984) und BAUMANN *et al.* (1987) zeigten eine Aktivierung von Hepatozyten durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α , resultierend in der Produktion der Akut-Phase-Proteine.

Im Gegensatz zur Akut-Phase-Reaktion gestalten sich die zellulären Abläufe in der subakuten oder chronischen Phase der Entzündung in der Leber verschieden. In chronischen Entzündungsprozessen kommt es zur Verlagerung der rekrutierten Leukozytenpopulationen. Es werden weniger Neutrophile, sondern primär Monozyten und Lymphozyten chemotaktisch zur Migration aktiviert. Zudem nimmt die Funktion der hepatischen Sternzellen eine immer bedeutendere Position ein und trägt im wesentlichen zur Bildung der Leberfibrose und letztendlich zum irreversiblen Stadium der Zirrhose bei. Hierbei kommt es in einem ersten Schritt zur Aktivierung der HSC, die durch LPS oder Zytokine induziert werden können. MARRA *et al.* konnten in Arbeiten der Jahre 1993 und 1999 eine HSC-Induktion durch TNF- α , IL-1 und IFN- γ nachweisen. MAHER beschreibt 2001 die Aktivierung von HSC durch proinflammatorische Zytokine, die von Kupffer Zellen sezerniert wurden. In Publikationen von RAMADORI *et al.* (1998), ENG *et al.* (2000) und MARRA (2002) ist beschrieben, daß aktivierte HSC eine Transformation in Myofibroblasten-ähnliche Zellen vollziehen, die verbunden ist mit der Fähigkeit zur Proliferation, Migration und der Synthese extrazellulärer Matrixproteine. Die Akkumulation der extrazellulären Matrix resultiert in fortschreitender Fibrose mit dem Endstadium der Zirrhose. Dieser Prozeß kann zudem durch einen zusätzlichen Mechanismus verstärkt werden, der auf der Fähigkeit der HSC zur Chemokin-Synthese basiert. Mehrere Arbeitsgruppen konnten die Produktion verschiedener Chemokine bei aktivierten HSC nachweisen (MARRA *et al.*, 1994, SPRENGER *et al.*, 1997, MAHER *et al.*, 1998, SPRENGER *et al.*, 1999). Die durch Chemokine vermittelte Rekrutierung von Leukozyten konnte 1998 von MARRA *et al.* gezeigt werden. Infiltrierte Leukozyten können ihrerseits Zytokine produzieren und erneut Sternzellen aktivieren, resultierend in einer vermehrten Produktion von extrazellulärer Matrix (KNITTEL *et al.*, 1997, SAILE *et al.*, 1999).

Für alle Zellpopulationen der Leber konnte eine Zytokin-Synthese nach Aktivierung detektiert werden. Wie anfangs erwähnt synthetisieren aktivierte Kupffer Zellen IL-1, IL-6 und TNF- α (DECKER 1990). Endotoxin-Inkubation resultiert in Endothelzellen in der Produktion von IL-1 und IL-6, wie von FEDER 1993 gezeigt werden konnte. In Sternzellen wiesen WANG *et al.* 1998 die Synthese von IL-10 nach und im Jahr 2001 wurde von MAHER die Produktion von TGF- β und IL-6 beschrieben.

Es wird deutlich, daß eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen am Entzündungsprozeß der Leber involviert sind und die verschiedensten Interaktionen zwischen den einzelnen Zellpopulationen möglich sind.

1.5 Zirkadiane Rhythmen

Alle lebenden Organismen sind täglich sich wiederholenden Veränderungen der Umwelt ausgesetzt; eine Anpassung an diese ist von fundamentaler Bedeutung (ASCHOFF 1981). Die Entwicklung einer inneren Uhr gibt dem Organismus die Möglichkeit, sich auf externe periodische Zyklen vorzubereiten und seine physiologischen Verhaltensweisen entsprechend anzupassen (DUNLAP 1999). Zirkadiane Rhythmik konnte in fast allen Organismen von den Cyanobakterien, Pilzen, Pflanzen, Insekten, Fischen bis hin zu den Nagetieren und Säugern nachgewiesen werden (TAKAHASHI 1995, DUNLAP 1999).

Zirkadiane Rhythmen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie unter konstanten Umweltbedingungen, d.h. ohne tageszeitliche Information, erhalten bleiben und dann eine endogene Periodenlänge τ haben, die von der 24 h Periodik der Umwelt abweicht. Die endogene Periodenlänge τ ist genetisch determiniert und beträgt ungefähr einen Tag, weshalb sie als zirkadian („circa diem“ bedeutet ungefähr ein Tag) bezeichnet wird. Unter natürlichen Bedingungen wird der endogene Rhythmus durch sogenannte *Zeitgeber* auf die 24 h Periodik der Umwelt synchronisiert. Hierbei ist der Licht-Dunkel-Wechsel als wichtigster natürlicher *Zeitgeber* anzusehen. Das zirkadiane System ist im wesentlichen aus drei Komponenten zusammengesetzt (BALSALOBRE 2002). Es besteht zum einen aus einem endogenen Oszillator bzw. Schrittmacher, der zur Generierung der zirkadianen Rhythmen dient. Als zweite Komponente enthält es Photorezeptoren und visuelle Afferenzen, welche die Synchronisation des Schrittmachers mit dem Tag-Nacht-Wechsel steuern. Das zirkadiane System besitzt als dritte Komponente efferente Mediatoren, die Signale des Schrittmachers an den Organismus weiterleiten und somit die Genexpression, Physiologie und das Verhalten regulieren.

Der endogene Oszillator von Säugetieren, einschließlich des Menschen, ist im "Nucleus supra-chiasmaticus" (SCN) lokalisiert, einer bilateralen Ansammlung von Nervenzellen links und rechts des dritten Ventrikels direkt oberhalb der Sehnervenkreuzung (Chiasma opticum) im Hypothalamus (RUSAK & ZUCKER 1979, BALSALOBRE 2002). Der SCN stellt eine autonome Einheit dar, die unabhängig aller externen *Zeitgeber* die eigene Rhythmizität aufrechterhalten kann (SCHWARTZ & GAINER 1977, INOUE & KAWAMURA 1979, GREEN & GILLETTE 1982, GROOS & HENDRIKS 1982). Der SCN läßt sich in zwei Bereiche unterteilen, den ventrolateralen und den dorsomedialen Bereich. Kennzeichnend für den ventrolateralen Bereich ist das Vorkommen der Neurotransmitter "Vasoactive intestinal polypeptide" (VIP) und "Neuropeptid Y" (NPY). Er stellt gewissermaßen die Eingangsregion des SCN dar, in der eine Vielzahl Axone von anderen Hirnarealen, sowie die direkte photische Projektion der Retina, enden. Die afferente Zuleitung von Lichtinformationen erfolgt in Säugetieren ausschließlich über Rezeptoren der Retina, die direkt über den "Tractus retinohypothalamicus" (RHT) zum SCN weitergeleitet werden. Charakteristisch für den dorsomedialen Bereich des SCN ist eine Großzahl von Vasopressin-Neuronen, von denen Axone zu verschiedenen anderen Arealen des Hypothalamus bzw. zu anderen zentralen Hirnstrukturen ziehen. Nach der Verarbeitung der Signale,

die zu Veränderungen der Phase im SCN führen können, werden die Informationen über neuronale sowie endokrine Mechanismen weitergeleitet und steuern die unterschiedlichsten Körperfunktionen und Verhaltensweisen (WOLLNIK & BIHLER 1996). In den nachfolgenden Kapiteln wird im Schwerpunkt der molekulare Aufbau des zirkadianen Oszillatorsystems, die daran beteiligten Gene sowie die intrazelluläre Signalweiterleitung beschrieben.

1.5.1 Molekulare Mechanismen des zirkadianen Oszillatorsystems

1.5.1.1 Identifizierung zirkadianer Uhrengene

Die genetische Basis des zirkadianen Systems wird seit über 30 Jahren erforscht und führte zur Identifizierung verschiedener sogenannter Uhrengene, auch als Clock-Gene bezeichnet. Erste Erkenntnisse wurden hierbei durch die Isolation zirkadianer Mutanten aus verschiedenen Spezies erhalten (OKAMURA *et al.*, 2002).

Im Jahr 1984 wurde als erstes Uhrengen das *Period*-Gen aus *Drosophila* isoliert und kloniert (REDDY *et al.*, 1984). Arbeiten von HARDIN *et al.* (1990) zeigten eine zirkadiane Oszillation der *Period*-Genprodukte sowie der zugrunde liegenden *Period*-mRNA. Sie zeigten, daß die Transkription des *Period*-Gens zu dem Zeitpunkt induziert wird, an dem die Menge des PERIOD-Proteins vermindert vorliegt. Somit war *Drosophila* die erste Spezies, in der eine negative Rückkopplung detektiert wurde. SEHGAL *et al.* identifizierten 1995 in *Drosophila* das zweite zyklisch exprimierte Uhrengen *Timeless*, für das eine Beteiligung an der Autoregulation von *Period* vermutet wurde. In den folgenden Jahren wurden zunehmend intensivere Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der zirkadianen Rhythmik in Säugern betrieben. Mutagenesestudien von VITATERNA *et al.* (1994) an einem als *Clock* bezeichneten Gen lieferten erste Hinweise darauf, daß der zirkadiane Rhythmus in Säugern wie bei *Drosophila* auf genetischer Ebene determiniert wird. In den Jahren 1997 und 1998 wurden von verschiedenen Gruppen drei weitere Uhrengene der Maus identifiziert. Die Gene *mPer1*, *mPer2* und *mPer3* stellen Homologe des *Drosophila Period*-Gens dar. Zusätzlich wurde in den Arbeiten von TEI *et al.* (1997) und SUN *et al.* (1997) das humane *Period*-Gen nachgewiesen. *Period* wird als Hauptoszillatorgen angesehen, das eine Schlüsselposition in der Regulation zirkadianer Rhythmen einnimmt. Es ist evolutionär hoch konserviert und zeigt eine 44% ige Homologie zu dem *Period*-Gen von *Drosophila* (SUN *et al.*, 1997). Die PERIOD-Proteine weisen eine "Period, Arnt, Sim" (PAS)-Domäne auf, die als Protein-Dimerisierungs-Domäne dient. Es konnte eine Bildung von Heterodimeren zwischen allen mPER-Proteinen nachgewiesen werden, sowie eine Homodimerisierung von mPER1 und mPER2 (ZYLKA *et al.*, 1998, KUME *et al.*, 1999). Expressionsanalysen konnten nachweisen, daß sowohl die *mPer*-Gene als auch das humane *hPer*-Gen im Bereich des SCN und der Retina sowie in verschiedenen peripheren Geweben exprimiert werden. Im SCN, wie auch in einigen peripheren Organen wies die mRNA aller *mPer*-Gene sowie deren entsprechende Proteine eine zirkadiane Oszillation auf

(ZYLKA *et al.*, 1998, KUME *et al.*, 1999). Der Phasenverlauf von *mPer1* und *mPer2* ist identisch, verhält sich jedoch asynchron, bzw. phasenverschoben. Die *mPer1*-Expression beginnt bei ZT24 hat ein Maximum bei ZT6, wohingegen der Expressionsstart für *mPer2* bei ZT6 liegt und ein Maximum bei ZT12 aufweist. Das *mPer3*-Gen zeigt im SCN ebenfalls zirkadiane Expression, die einen ähnlichen Phasenverlauf wie *mPer1* und *mPer2* aufweist. In der Retina verläuft die gesamte *mPer*-Expression synchron, zeigt jedoch eine Differenz von 3-6 h zum *mPer*-Rhythmus des SCN. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß *mPer1* und *mPer2*, nicht jedoch *mPer3* während der subjektiven Nacht lichtinduzierbar ist und somit einen initialen molekularen Effekt auf die Lichtsynchronisation zu haben scheint (ZYLKA *et al.*, 1998).

Nach der Identifizierung des Uhrgens *Clock* von VITATERNA *et al.* (1994) konnte KING *et al.* im Jahr 1997 durch die Klonierung des murinen *Clock*-Gens zeigen, daß es sich bei dem CLOCK-Protein um einen Transkriptionsfaktor der PAS/ "basic helix-loop-helix" (bHLH)-Familie handelt. Die PAS-Domäne stellt hierbei die Protein-Dimerisierungs-Domäne dar, wohingegen die bHLH-Domäne für die DNA-Bindung verantwortlich ist. Expressionsanalysen zeigen, daß *Clock* sehr weitverbreitet exprimiert wird und neben dem Hypothalamus und der Retina noch in zahlreichen peripheren Geweben detektiert werden konnte. Eine rhythmische Expression konnte für *Clock* nicht gezeigt werden. Die nachgewiesene PAS-Domäne läßt vermuten, daß CLOCK in Verbindung mit anderen Proteinen die zirkadiane Oszillation mittels Transkriptionsregulation steuert (KING *et al.*, 1997). GEKAKIS *et al.* identifizierten 1998 ein zweites murines PAS/bHLH-Protein das als BMAL1 bezeichnet wurde. Die Expression von *Bmal1* verläuft im SCN rhythmisch, wobei die Phase entgegengesetzt der Phase von *mPer1* und *mPer2* läuft. *Bmal1* erreicht seine höchste Transkriptionsrate bei ZT15 bis 18 (SHEARMAN *et al.*, 2000). CLOCK und BMAL1 heterodimerisieren und CLOCK/BMAL1-Heterodimere ihrerseits aktivieren die Transkription von *mPer* über die Bindung an E-Box-Elemente in der *mPer*-Promotorregion (GEKAKIS *et al.*, 1999). E-Box-Elemente stellen typische Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren dar und sind für die positive Regulation der *Per*-Expression notwendig (HAO *et al.*, 1997). CLOCK/BMAL1-Heterodimere repräsentieren somit die positiven Elemente der transkriptionellen Oszillation von *Period* (GEKAKIS *et al.*, 1999). Ein weiterer Faktor des murinen Oszillatorsystems wurde 1998 von SANGORAM *et al.* und ZYLKA *et al.* identifiziert. Das murine *Timeless* (*mTim*) stellt ein Homolog des Drosophila *Timeless*-Gens dar. Es ist im SCN exprimiert, jedoch scheinen weder *mTim*-mRNA noch mTIM-Protein im Kern zu oszillieren (SHEARMAN *et al.*, 2000). Vermutlich partizipiert mTIM als negative Komponente des Rückkopplungsmechanismus im Kern mit den drei mPER-Proteinen, eine genaue Funktion von *mTim* ist jedoch noch unklar (KUME *et al.*, 1999).

Im Jahr 1998 wurden zwei neue zirkadian exprimierte Gene in Drosophila von ALLADA *et al.* und RUTILA *et al.* identifiziert. Es handelt sich hierbei um die Transkriptionsfaktoren dCLOCK und dCYCLE, die der Familie der PAS/bHLH-Proteine zuzuordnen sind. Hierbei ist dCLOCK (dCLK) das Homolog des murinen CLOCK und dCYCLE (dCYC) entspricht dem humanen BMAL1. RUTILA *et*

al. (1998) vermuteten die Bildung von CYC/CLK-Heterodimeren, die ihrerseits an E-Box-Elemente der *Per*- und *Tim*-Promotoren binden und somit eine wesentliche Bedeutung in der transkriptionellen Regulation der Uhrgene von *Drosophila* einnehmen.

In Untersuchungen von KUME *et al.* wurden 1999 zwei weitere Uhrgene der Maus identifiziert, *Cryptochrom1 (Cry1)* und *Cryptochrom2 (Cry2)*. Die essentielle Bedeutung dieser Komponenten im murinen Oszillatorsystem konnte 1999 durch Untersuchungen von VAN DER HORST gezeigt werden, in denen *mCry1*- und *mCry2*-defiziente Mäuse einen kompletten Verlust der zirkadianen Rhythmik des lokomotorischen Verhaltens aufwiesen. CRY-Proteine sind Pterin/Flavin enthaltende Proteine und scheinen im Laufe der Evolution aus Licht-Rezeptoren der Pflanzen (Cryptochrome) hervorgegangen zu sein. Die Säuger-Homologe zeigen keine Photoaktivierung. Die murinen *Cryptochrom*-Gene *mCry1* und *mCry2* werden beide im SCN exprimiert, aber nur *mCry1* weist dort eine zirkadiane Oszillation auf. Der Rhythmus von *mCry1* ähnelt am meisten der Oszillation von *mPer2* im SCN. KUME *et al.* (1999) vermuteten, daß *mCry1* und *mCry2* die negativen Komponenten des Rückkopplungsmechanismus darstellen. Sie konnten zeigen, daß mCRY1 und mCRY2 zur Interaktion mit jedem der mPER-Proteine befähigt sind, und diese vom Cytoplasma in den Nukleus transportieren können. Mit der Identifizierung der *Cryptochrome* sind die wesentlichen Uhrgene des zirkadianen Oszillatorsystems beschrieben. Der Mechanismus wie diese Elemente zusammenwirken wird in den folgenden Kapiteln beschrieben.

1.5.1.2 Identifizierung des molekularen Mechanismus der negativen Rückkopplung

Im vorangegangenen Kapitel wurde das Hauptaugenmerk auf die Identifizierung der Uhrgene gelegt, die Interaktionen zwischen den Uhrgenen sowie der molekulare Mechanismus der zirkadianen Oszillation wurde lediglich angeschnitten. Außer den Modellorganismen Maus und *Drosophila*, die im vorangegangenen Kapitel näher beschrieben wurden, gibt es noch zahlreiche andere Modellorganismen zirkadianer Rhythmik wie zum Beispiel *Chlamydomonas reinhardi* (BRUCE 1972) oder *Neurospora crassa* (FELDMAN & HOYLE 1973). Gemeinsam ist allen Organismen der Aufbau des Oszillators aus verschiedenen tagesrhythmisch exprimierten Genen und das Prinzip der negativen Rückkopplung in der Transkription und Translation der Uhrgene.

Das Prinzip der negativen Rückkopplung, dargestellt in Abbildung 1, basiert auf der rhythmischen Expression der RNA von Uhrgenen, resultierend in rhythmischer Akkumulation der Uhrenproteine. Die Proteine ihrerseits hemmen anschließend ihre eigene Expression, indem sie die eigenen Transkriptionsfaktoren durch direkte Protein-Protein-Interaktion inhibieren. Der ebenfalls rhythmisch gesteuerte Abbau der Uhrenproteine sorgt nach einem Tag für eine erneute Aktivierung der Genexpression, so daß ein neuer Zyklus beginnen kann. Interessanterweise benutzen Fruchtfliege sowie Säuger, inklusive des Menschen, die gleichen Gene zur Zeitmessung, wenn auch mit teilweise unterschiedlicher Funktion (DUNLAP 1998, DUNLAP 1999). Da im Rahmen dieser Arbeit

molekularbiologische Untersuchungen des humanen Uhrgens *hPer1* durchgeführt wurden, beziehen sich nachfolgende Ausführungen ausschließlich auf die molekularen Mechanismen in Säugern.

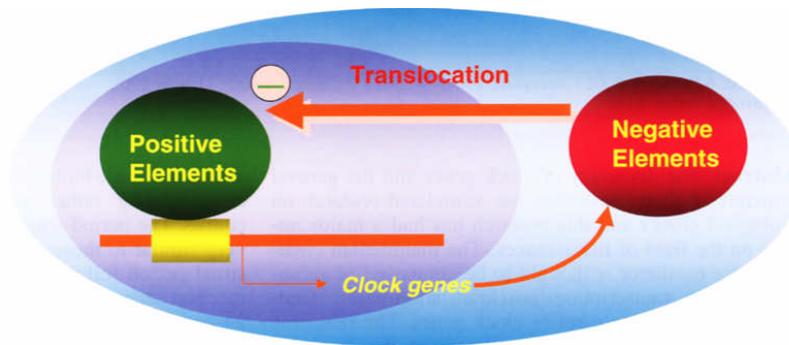


Abbildung 1

Allgemeiner Mechanismus der negativen Rückkopplung der inneren Uhr nach OKAMURA et al. (2002). Positive Faktoren stimulieren die Transkription der Uhrgene. Ihre transkriptionellen Produkte regulieren die Transkription ihrer eigenen Gene in einer negativen Weise

1.5.2 Molekulare Mechanismen der zirkadianen Uhr in der Maus

1.5.2.1 Generierung des zirkadianen Rhythmus durch transkriptionelle und translationelle Rückkopplungsschleifen verschiedener Uhrgene

Stellvertretend für Säuger wird die Maus im Rahmen dieser Arbeit als Modellorganismus für die Charakterisierung zirkadianer Rhythmik vorgestellt. Der molekulare Mechanismus der negativen Rückkopplung in der Maus ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Als Hauptoszillatorgene des zirkadianen Systems werden die *Period*-Gene *mPer1* und *mPer2* angesehen. Ihre Transkription wird durch die Bindung von CLOCK/BMAL1-Heterodimeren an die E-Box-Elemente des *mPer1*-Promotors (GEKAKIS *et al.*, 1997) und eventuell des *mPer2*-Promotors (OKAMURA *et al.*, 2002) aktiviert. Hierbei erfolgt die Heterodimerisierung über die PAS-Domäne von CLOCK und BMAL1, die Interaktion mit der Promotorregion wird über die bHLH-DNA-Bindungsdomäne vermittelt. Die Promotorregion von *mPer1* enthält drei E-Box-Elemente, wobei für die CLOCK/BMAL1-induzierte *mPer1*-Aktivierung die Bindung an ein Element ausreichend ist (GEKAKIS *et al.*, 1998). Die Transkriptionsaktivierung resultiert in mRNA-Bildung von *mPer1* und *mPer2* und anschließender Akkumulation der mPER1- und mPER2-Proteine im Cytoplasma. Erreicht die Protein-Konzentration einen bestimmten Wert, kommt es in einem weiteren Schritt zur Translokation von mPER1 und mPER2 in den Nukleus, der wesentlich für die Generierung der Oszillation verantwortlich ist.

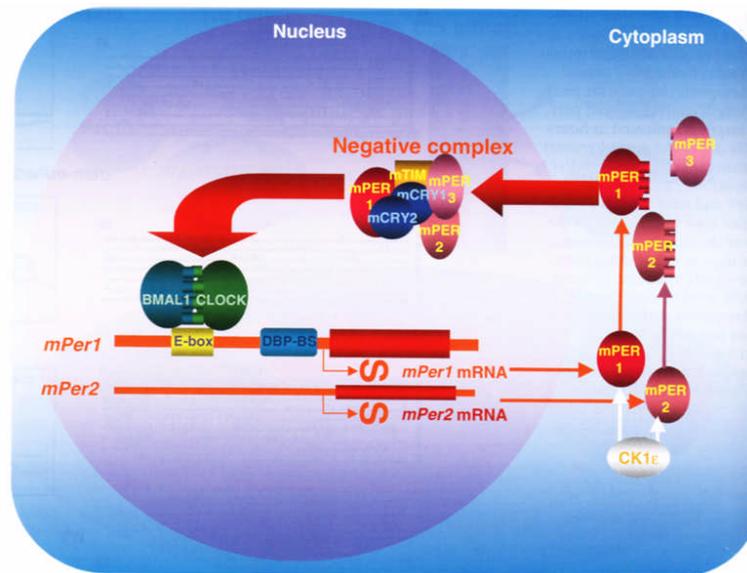


Abbildung 2

Modell der zentralen Rückkopplungsschleifen in der zirkadianen Uhr von Säugern nach OKAMURA *et al.* (2002). Nähere Erklärungen sind dem Text aus 1.5.2.1 zu entnehmen.

Im Kern kommt es zur Formation von Komplexen, die mPER1, mPER2, mPER3, mCRY1, mCRY2 sowie mTIM enthalten können. Die Bindung negativer Faktoren an die positiven Elemente CLOCK und BMAL1 führt zur Suppression der *mPer1*- und *mPer2*-Genexpression. Von KUME *et al.* (1999) konnte gezeigt werden, daß mCRY1 und mCRY2 das größte Potential zur Hemmung der CLOCK/BMAL1-induzierten *mPer1*-Transkription besitzen. GRIFFIN *et al.* konnten 1999 in Untersuchungen zeigen, daß es bei der Interaktion zwischen positiven und negativen Faktoren zu einem direkten Kontakt zwischen CRY1 und BMAL1, sowie zwischen CRY2 und CLOCK kommt. Für CRY1 und CRY2 konnte zudem eine Interaktion mit PER1, PER2 und TIM nachgewiesen werden (GRIFFIN *et al.*, 1999). Die wesentliche Bedeutung von *mCry1*, *mCry2* und *Bmal1* in der negativen Rückkopplung konnte von BUNGER *et al.* (2000) bestätigt werden. Hierbei konnte in Knock-out Mäusen für *mCry1* und *mCry2* sowie für *Bmal1* ein unmittelbarer Verlust des rhythmischen Verhaltens im Dauerdunkel ermittelt werden. LEE *et al.* zeigten 2001 eine direkte Interaktion von mCRY und CLOCK, eine mPER/CLOCK Interaktion war nicht nachweisbar. Zudem führten sie den Nachweis, daß CLOCK sowie BMAL1 während des gesamten zirkadianen Zyklus konstitutiv an die E-Box-Elemente gebunden vorliegen (LEE *et al.*, 2001).

Nach Abnahme der negativen Faktoren, die ebenfalls rhythmisch gesteuert wird, kommt es nach einem Tag zu einer erneuten Aktivierung der Genexpression und dem Beginn eines weiteren Zyklus. Es wird diskutiert, ob außer der zentralen negativen Rückkopplung weitere Rückkopplungsschleifen existieren, die in der zirkadianen Oszillation involviert sind (GLOSSOP *et al.*, 1999, LEE *et al.*, 2000, SHEARMAN *et al.*, 2000, VIELHABER *et al.*, 2000, BAE *et al.*, 2001). SHEARMAN *et al.* (2000) postulierten neben dem zentralen negativen Rückkopplungsmechanismus eine weitere positive

Rückkopplungsschleife, durch die rhythmische Expression von *Bmal1* unter Beteiligung von mPER2 gesteuert wird. Es wird vermutet, daß hierbei die positive Regulation der *Bmal1*-Transkription durch mPER2 positiv reguliert werden kann, indem mPER2 einen bisher nicht identifizierten Aktivator in den Nukleus transportiert und/oder als Koaktivator dient.

1.5.2.2 Akzessorische Rückkopplungsmechanismen

Der zentrale Rückkopplungsmechanismus ist für die Generierung der zirkadianen Oszillation von großer Bedeutung und evolutionär hoch konserviert. Von YAMAGUCHI *et al.* wurde 2000 eine weitere, den Hauptmechanismus ergänzende Rückkopplung identifiziert, an der das „albumin gene D-site binding protein“ (DBP) beteiligt ist. DBP gehört zur Familie der PAR/Leuzin Zipper Transkriptionsfaktoren und weist im SCN eindeutige rhythmische Expression auf, deren Amplitude der von *mPer1* ähnelt und lichtunabhängig ist (YAMAGUCHI *et al.*, 2000). In Untersuchungen von YAMAGUCHI *et al.* (2000) konnte demonstriert werden, daß die direkte Bindung von DBP an den *mPer1*-Promotor in einer additiven Zunahme der *mPer1*-Transkription resultiert. Zudem konnte DBP-Protein im Nukleus der Oszillatorzellen des SCN detektiert werden, was parallel zu dem Anstieg an *mPer1*-RNA verlief. Die Transkription von *dbp* unterliegt entsprechend der *mPer1*-Transkription, einer Regulation durch CLOCK/BMAL1 und PER/CRY. Aufgrund der Daten kann vermutet werden, daß PAR-Proteine wie DBP an einer neuen Rückkopplungsschleife beteiligt sind und somit zusätzliche Faktoren repräsentieren, die zur Verstärkung der *mPer1*-Transkription beitragen und eine wesentliche Rolle in der zentralen Oszillation einnehmen.

1.5.3 Zirkadiane Oszillation in peripheren Geweben

Der Oszillator der zirkadianen Uhr ist in Säugern neben der Generierung des biologischen Rhythmus für die Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse verantwortlich wie beispielsweise Blutdruck, Herzfrequenz, Körpertemperatur, Schlaf-Wach-Zyklus, Nierenaktivität oder Lebermetabolismus (HASTINGS 1997). Untersuchungen haben gezeigt, daß molekulare Oszillatoren auch in peripheren Geweben (ZYLKA *et al.*, 1998) sowie in immortalisierten Zelllinien vorkommen (BALSALOBRE *et al.*, 1998). Der genaue Mechanismus, wie diese multiplen Rhythmen gekoppelt sind, um ein zusammenhängendes System zu bilden, ist noch unklar. Verschiedene Untersuchungen gaben Hinweise auf eine Synchronisation der peripheren Oszillatoren durch den Oszillator des SCN, der an der Spitze der Hierarchie des zirkadianen Systems steht. So konnten SAKAMOTO *et al.* (1998) in Tieren, die eine Läsion des SCN aufwiesen, den Verlust der rhythmischen Oszillation der *mPer2*-mRNA zeigen, einhergehend mit einer Arrhythmik im Verhalten. ZYLKA *et al.* wiesen 1998 in peripheren Organen wie Lunge, Leber oder Herz eine vergleichbare zirkadiane Rhythmik des Uhrens *Period* nach, wie sie im SCN vorliegt. Es war jedoch eine Phasenverzögerung in der Oszillation von 3-9 h relativ zur

Oszillation des SCN feststellbar. YAMAZAKI *et al.* (2000) zeigten, daß die *mPer1*-Oszillation in Gewebekulturen peripherer Organe rasch abschwächt, wohingegen der zirkadiane Rhythmus im SCN über Wochen erhalten bleibt. Die an der Synchronisation der peripheren Oszillatoren beteiligten Mechanismen sind noch weitgehend unklar. Es wird vermutet, daß der zentrale Oszillator des SCN die Steuerung der Synchronisation über neurale und humorale Signale vermittelt (ISHIDA *et al.*, 1999, AKASHI & NISHIDA 2000).

Den stärksten externen *Zeitgeber*, der den biologischen Rhythmus mit dem Rhythmus der Umgebung synchronisiert, stellt der Licht-Dunkel-Zyklus dar. YOUNG beschreibt 2000 den Effekt von Licht auf den Oszillator des SCN und der Leber. Hierbei kann die zirkadiane Oszillation der Uhrgene im SCN durch Lichtimpulse synchronisiert werden, wohingegen zirkadiane Rhythmik in peripheren Geweben nicht photo-responsiv zu sein scheint.

Neben dem Faktor Licht sind weitere Komponenten bekannt, die zur Synchronisation des zirkadianen Rhythmus beitragen können wie beispielsweise Temperatur, Lärm, Soziale Kontakte oder eine rhythmische Nahrungsquelle. Der Effekt dieser rhythmischen Signale auf das Verhalten ist jedoch oft nur schwach ausgeprägt (STOKKAN *et al.*, 2001). Der Faktor Nahrung allerdings nimmt neben dem Licht-Dunkel-Zyklus im Organismus, speziell der Leber, eine bedeutende Stellung in der Synchronisation der zirkadianen Rhythmik ein (MISTLBERGER 1994).

Untersuchungen haben gezeigt, daß eine beschränkte Nahrungszufuhr ("restricted feeding" (RF)) zu bestimmten Zeitpunkten zu einer Phasenverschiebung der zirkadianen Oszillation in der Leber führen kann (STOKKAN *et al.*, 2001). Abrupte und massive Änderungen in der Nahrungsverfügbarkeit kann zu einem Zurücksetzen der rhythmischen Genexpression führen. Die zirkadiane Oszillation des SCN hingegen bleibt durch den *Zeitgeber* Nahrung unbeeinflusst (DAMIOLA *et al.*, 2000). Die Oszillatoren des SCN und der Leber scheinen demnach spezifisch auf unterschiedliche Reize zu reagieren (ROENNEBERG & MERROW 2002).

Die an der Phasenverschiebung beteiligten Signalwege sind bisher noch weitgehend unklar. Es konnte gezeigt werden, daß Glukokortikoide als potente endogene *Zeitgeber* in der Leber sowie weiteren peripheren Geweben fungieren, nicht jedoch eine Synchronisation durch Nahrung medieren können (BALSALOBRE *et al.*, 2000). STOKKAN *et al.* (2001) beschreiben eine Phasenverschiebung durch Dexamethason, das jedoch keinen Effekt während der Nahrungsbeschränkung zeigt, in der eine erhöhte Konzentration an Kortikosteronen vorliegt. Zusätzliche Experimente mit Mausmutanten, die einen defekten Leber-spezifischen Glukokortikoid-Rezeptoren aufweisen, implizieren, daß der Glukokortikoid-Signalweg der Synchronisation eher entgegenwirkt, als fördern ist (DAMIOLA *et al.*, 2000).

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Signaltransduktionswege sowie beteiligter Mediatoren, die zur Aktivierung der humanen Gene CCL15 (HCC-2) und *Period1* (*hPer1*) führen. Die Untersuchungen wurden mittels Luciferase-Reportergen Test durchgeführt. Das hierbei verwendete Promotorkonstrukt pCC2-luc enthielt putative Sequenzregionen des CCL15-Promotors und *hPER1*-luc einen Sequenzbereich des *hPer1*-Promotors. Für die Untersuchungen im Luciferase-Reportergen Test wurden die Promotorkonstrukte einer humanen Hepatoma Zelllinie (HuH-7) transient bzw. stabil transfiziert. Analysen mit pharmakologischen Substanzen sowie verschiedenen Expressionsplasmiden sollten zeigen, welche bekannten oder unbekanntem Signalwege und Signalmoleküle zu einer Stimulation oder Hemmung des jeweiligen Promotorkonstrukts führen. Zusätzlich wurden proteinchemische Untersuchungen mittels Western-Blot Technik zur Identifizierung putativer Mediatoren durchgeführt. Für die Untersuchung von CCL15 wurden zudem Expressionsanalysen mittels RT-PCR (*TaqMan*-Analysen) in humanen Geweben und Zelllinien durchgeführt. Diese sollten Aufschluß über ein geeignetes Zellsystem geben, sowie Rückschlüsse auf die biologische Funktion von CCL15 liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Laborgerät (Bezeichnung/Modell)	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur	Renner, Darmstadt, Germany
Analytik-Waage (AC 120 S)	Sartorius, Göttingen, Germany
Bioklav (3.021 001)	Schütt, Göttingen, Germany
CO ₂ Inkubationsschrank (IG 150)	Jouan, Unterhaching, Germany
DNA-Sequencer (Modell 310)	AppliedBiosystems, Weiterstadt, Germany
Gel-Dokumentationssystem EDAS 290	Kodak, Stuttgart, Germany
Kulturschüttler (Innova™ 4230)	Brunswick Scientific, Cambridge, UK
Laborwaage (MC 1)	Sartorius, Göttingen, Germany
LumiStar®, Luminometer	BMG LabTechnologies, Offenburg, Germany
Minishaker MS2	IKA-Labortechnik, Staufen, Germany
Multipette (4780)	Eppendorf, Hamburg, Germany
Mehrkanal-Pipette Response	Eppendorf, Hamburg, Germany
Mehrkanal-Pipette Proline	Biohit Deutschland GmbH, Köln, Germany
Mikroskop (ID 03)	Zeiss, Göttingen, Germany
PCR-Cycler (Gene Amp 2400)	AppliedBiosystems, Weiterstadt, Germany
pH-Meter (CG 804)	Schott, Hofheim i.Ts., Germany
Pipetten (References)	Eppendorf, Hamburg, Germany
Pipettboy (accu-jet)	Brand, Wertheim, Germany
Reinstwasseranlage (Mili-Q ^{UF} plus)	Milipore, Eschborn, Germany
Speedvac Univapo (150 H)	Uniequip, Martinsried, Germany
Spektralphotometer (DU® 640)	Beckmann, München, Germany
Sterile Werkbank (Typ 8511)	Köttermann, Uetze-Hänigsen, Germany
ABI PRISM™ 7700 Sequencer Detector	AppliedBiosystems, Weiterstadt, Germany
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Germany
Tischzentrifuge (Typ 112)	Sigma, Hanau, Germany
Trockenschrank (B 6760)	Heraeus, Osterode, Germany
Ultraschallgerät (Vibra cell)	Sonic & Materials, Dambary, USA
Wasserbad (HBR 4)	IKA-Labortechnik, Staufen, Germany
Zentrifuge (2K 15)	Sigma, Hanau, Germany
Zentrifuge Rotixa/RP	Hettich, Tuttlingen, Germany

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Materialien für die allgemeine Laborarbeit (Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Glaswaren usw.) wurden von den Firmen Greiner (Nürnberg), Eppendorf (Hamburg), Nunc (Wiesbaden) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Alle weiteren Materialien sind mit Hersteller nachfolgend aufgeführt.

Bezeichnung	Hersteller
Agarose MP	AppliChem, Darmstadt, Germany
Antioxidants	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Germany
Biodyne® PLUS Membran 0,45 µm	Pall GmbH, Dreieich, Germany
dNTP's	Fermentas, St. Leon-Rot, Germany
DMSO	Roth, Karlsruhe, Germany
DTT	Sigma, Deisenhofen, Germany
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Germany
Fetales Kälber Serum (FCS)	BioWhittaker, Aachen, Germany
Filterkarton Whatman 3 mm	Roth, Karlsruhe, Germany
Geneticin (G 418)50 mg/ml	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
L-Glutamin 200 mM (100 ×)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Hefe-Extrakt	Sigma, Deisenhofen, Germany
Mehrfachkulturschalen, 6-, 24-, 96-Well	Corning Costar, NY, USA
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Germany
Methanol	Merck, Darmstadt, Germany
NaCl	Merck, Darmstadt, Germany
PBS Dulbecco's	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Polyethylenglykol (PEG 8000)	Merck, Darmstadt, Germany
Penicillin/Streptomycin 10.000 µg/ml	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Röntgenfilm, CL-XPosure™	Perbio Science, Illinois, USA
Röntgenfilmentwickler Rodinal B&W	Agfa-Gevaert, Leverkusen, Germany
Röntgenfilmfixierer Tetenal Superfix	Tetenal Photowerk, Norderstedt, Germany
SDS	AppliChem, Darmstadt, Germany
Tris	AppliChem, Darmstadt, Germany
Trypsin/EDTA-Lösung (10 ×)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Germany
Wasser A.C.S. Reagenz	Sigma, Deisenhofen, Germany
Zellkulturflaschen, 25 cm ² , 75 cm ²	Sarstedt, Newton, NC, USA
Zellkulturschalen, 100 x 20 mm	Falcon/Becton-Dickensen, Bedford, MA

2.1.3 Reagenzien zur Herstellung von Lösungen für molekular- und zellbiologische Zwecke

Zum Ansetzen von Pufferlösungen, Nährmedien und Nähragar wurde ausschließlich deionisiertes Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q^{UF} plus, Millipore) verwendet. Für molekularbiologische Zwecke wurde steriles, schwermetallfreies Wasser (ACS-grade) genutzt. Lösungsmittel und Feinchemikalien, die zur Reagenzienherstellung benötigt wurden besaßen Analysequalität.

2.1.4 Enzyme und Reagenziensätze

Enzyme, die in dieser Arbeit für molekularbiologische Untersuchungen verwendet wurden, sind nachfolgend mit den entsprechenden Bezugsquellen aufgelistet.

Enzym / Bezeichnung	Hersteller
Alkalische Phosphatase, Shrimps	Promega, Heidelberg, Germany
DNA-Polymerase, Taq Polymerase	Qiagen, Hilden, Germany
DNA-Ligase, T4 DNA Ligase	Promega, Heidelberg, Germany
Restriktionsendonucleasen (KpnI, PstI, XhoI, XmaI)	BioWhittaker, Aachen, Germany
RNase-Inhibitor, RNAsin	Promega, Heidelberg, Germany
Superscript TM II, Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Germany

Für molekular- und zellbiologische Routinearbeiten wurden zur schnelleren und einheitlichen Durchführung die angegebenen Reagenziensätze („Kits“) verwendet.

Bezeichnung	Hersteller
ABI PRISM TM BigDye Terminator Cycle-Sequencing Ready Reaction Kit	AppliedBiosystems, Weiterstadt, Germany
Effectene TM Transfection Reagent	Qiagen, Hilden, Germany
Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
NucleoSpin Extract Kit	Macherey-Nagel, Düren, Germany
NucleoSpin [®] Plasmid-Kit	Macherey-Nagel, Düren, Germany
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden, Germany
TaqMan [®] Universal PCR MasterMix	AppliedBiosystems, Weiterstadt, Germany

2.1.5 Bakterienstämme und Plasmide

Molekular- und zellbiologische Experimente wurden im Rahmen dieser Arbeit mit den aufgeführten Bakterienstämmen und Plasmiden durchgeführt.

Bakterienstamm	Genotyp / relevante Eigenschaften	Anbieter / Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL2Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac</i> [F', <i>proAB, lacI^q, lacZΔM15, Tn10(Tet^r) Amy Cam^r</i>]	Statagene®, Amsterdam, Niederlande
Plasmide	relevante Eigenschaften	Anbieter / Referenz
pcDNA3.1 neo (-) (XhoI/HindIII)	Klonierungs-Vektor mit Neomycin-Gen (Geneticin (G418)-Resistenz) zur Selektion stabil transfizierter Zellen	Invitrogen®, Karlsruhe, Germany
pGL2-control-Vektor	Luciferase-Reportergen-Vektor, SV-40-Promotor	Promega®, Heidelberg, Germany
pCC-2-luc	Luciferase-Reportergen-Konstrukt mit einer Teilsequenz des potentiellen CCL15-Promotors	PARDIGOL 1996 Dissertationsschrift
K-CREB	Dominanter Repressor von CREB; Bildner von CREB:K-CREB Heterodimeren	Walton <i>et al.</i> , 1992
A-CREB	Dominant negativer Inhibitor der Phospho-CREB-Dimerisierung	AHN <i>et al.</i> , 1998
PKI	Kompetetiver Inhibitor der PKA	DAY <i>et al.</i> , 1989
C α	Isoenzym der katalytischen Untereinheit der PKA	HOWARD <i>et al.</i> , 1991
A-FOS	Dominant negative Form von c-fos; inaktiviert die DNA-Bindung von fos-jun-Heterodimeren und die jun-abhängige Transaktivierung	OLIVE <i>et al.</i> , 1997
A-C/EBP	Dominant negative Form von C/EBP, verhindert die Transaktivierung von C/EBP	KTYLOV <i>et al.</i> , 1995
<i>hPER1-luc</i>	Luciferase-Reportergen-Konstrukt mit einer Teilsequenz des potentiellen <i>hPer1</i> -Promotors	MOTZKUS <i>et al.</i> , 2000
CLOCK	PAS/bHLH-Protein, das mit BMAL1 zur Transkriptionsaktivierung des Uhrengens <i>Period</i> führt	KING <i>et al.</i> , 1997
BMAL1	PAS/bHLH-Protein, das mit CLOCK zur Transkriptionsaktivierung des Uhrengens <i>Period</i> führt	GEKAKIS <i>et al.</i> , 1998
CRY2	Negatives Uhrengens, das CLOCK/BMAL1 inhibiert und somit die <i>Per</i> -Expression hemmt	KUME <i>et al.</i> , 1999

2.1.6 Oligonukleotide

Die zur Überprüfung der cDNA-Sequenzen sowie für Standard-PCR Reaktionen und Real-Time PCR benötigten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg), TibMolBiol (Berlin) und Perkin-Elmer (Weiterstadt) bezogen und sind nachfolgend aufgeführt.

Bezeichnung / Richtung	Oligonukleotidsequenz 5'® 3'	Bemerkungen
Jump1-forward	CAGCCCAAGCTACCATGATAAGTA	PCR-Oligonukleotid für pCC-2-luc
Jump1-reverse	GACCTTTGGATTTTCGGTACCTCCC GGTT ATG	PCR-Oligonukleotid für pCC-2-luc
Jump2-forward	GGGAGGTACCGAAATCCAAAGGTCAAAC CA	PCR-Oligonukleotid für pCC-2-luc
Jump2-reverse	CCAGGAGGTGTTAGCAGTGGTGAATC	PCR-Oligonukleotid für pCC-2-luc
North1-forward	CTGCCCTCTCCTGCCTCAT	<i>TaqMan</i> -Oligonukleotid für CCL15
Chem2-forward	TTTGAAACGAGCAGCGAGTG	<i>TaqMan</i> -Oligonukleotid für CCL15
Chem2-reverse	AGACTTGCCGCCCTTCTT	<i>TaqMan</i> -Oligonukleotid für CCL15
Chem2 probe	FAM- TCCAAGCCAGGTGTCATATTCCTCAC- XTP ¹⁾	<i>TaqMan</i> -Oligonukleotid für CCL15 (FAM-markiert)
GAPDH-forward	CCTGCACCACCAACTG	<i>TaqMan</i> -Oligonukleotid für <i>Housekeeping-Gen</i>
GAPDH-reverse	CATGAGTCCTTCCACGATACCA	<i>TaqMan</i> -Oligonukleotid für <i>Housekeeping-Gen</i>
GAPDH probe	FAM- CCTGGCCAAGGTCTCCA- XTC ¹⁾	<i>TaqMan</i> -Oligonukleotid für <i>Housekeeping-Gen</i> (FAM-markiert)

¹⁾ FAM (6-Carboxy-Fluoreszein) bezeichnet den Reporter-Farbstoff; XTC den *Quencher* TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) und XTP den passiven Referenzfarbstoff ROX (6-Carboxy-X-Rhodamin)

2.1.7 Größenstandards

Größenmarker / Bezeichnung	Hersteller
DNA-Größenmarker	
100 Basenpaarleiter	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
2072 Bp, 1500 Bp, 1400 Bp, 1300 Bp, 1200 Bp, 1100 Bp, 1000 Bp, 900 Bp, 800 Bp, 700 Bp, 600 Bp, 500 Bp, 400 Bp, 300 Bp, 200 Bp, 100 Bp	
1 Kilobasenpaarleiter	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
12216 Bp, 11198 Bp, 10180 Bp, 9162 Bp, 8144 Bp, 7126 Bp, 6108 Bp, 5090 Bp, 4072 Bp, 3054 Bp, 2036 Bp, 1636 Bp, 1018 Bp, 506 Bp, 396 Bp, 344 Bp, 298 Bp	
Protein-Größenmarker	
Prestained Protein Marker	New England Biolabs, Schwalbach, Germany
175 kDa, 83 kDa, 62 kDa, 47.5 kDa, 32.5 kDa, 25 kDa, 16.5 kDa, 6.5 kDa	

2.2 Methoden

2.2.1 Sterilisierung und RNasebehandlung

Alle Glaswaren, Plastikgefäße, Pipettenspitzen, Röhrchen sowie thermostabile wässrige Lösungen wurden vor der Benutzung durch 20 minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Für Versuche der RNA-Analyse wurden Glaswaren für 4 Stunden einer Temperatur von 280°C ausgesetzt; Lösungen über Nacht DepC behandelt und anschließend autoklaviert. Bei Lösungen, die nicht mit feuchter Hitze behandelt werden konnten, wurden über Cellulose-Acetat-Phthalat (CAP)-Membranfilter eine Sterilfiltration durchgeführt (Filtropur, Sarstedt, Ø 0,22 µm oder 0,45 µm). Die Entkeimung von Metall- und Keramikwaren erfolgte für 3 h bei 180°C trockener Hitze.

2.2.2 Standardmethoden im Umgang mit eukaryotischen Zellen

2.2.2.1 Kulturhaltung adhärenter Zellen

Als Richtlinie für das Arbeiten mit humanen Zellkulturen wurden die allgemeinen Empfehlungen von LINDL *et al.* (2000) zugrunde gelegt. Die für die Experimente genutzten Arbeitskulturen wurden unter Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Die in flüssigem Stickstoff

gelagerten Dauerkulturen wurden bei Bedarf vorsichtig in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in eine 75 cm² Kulturflasche mit 20 ml Medium überführt. Zur Entfernung des im Einfriermedium enthaltenen DMSO wurde das Medium am nächsten Tag vollständig gewechselt.

Das Passagieren der Zellen erfolgte jeden zweiten bis dritten Tag, bei einer Konfluenz von 70-90%. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels 1% Trypsin/EDTA abgelöst. Durch Zugabe von Medium wurde das Trypsin inaktiviert, die Zellen in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 7 min bei 700 x g sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und in entsprechender Verdünnung in neuen Flaschen kultiviert.

Zur Erstellung von Dauerkulturen wurden die Arbeitskulturen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden hierzu trypsiniert, zentrifugiert und in Einfriermedium in einer Dichte von 1,5 x 10⁶ Zellen/ml weggefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte für die ersten 48 h bei – 80°C, anschließend in flüssigem Stickstoff.

Verwendete Zelllinien

Zellstamm	Gewebe / Morphologie / relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
HuH-7 Wildtyp	humane hepatoma-Zelllinie; adhärent als einschichtiger Zellrasen („monolayer“) wachsend.	Etabliert aus der Resektion der Leber eines 57 Jahre alten Patienten NAKABAYSHI <i>et al.</i> , 1982

Verwendete Agentien zur Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Zellstamm	Kulturmedium
HuH-7 Wildtyp	DMEM, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Sodium Pyruvat, 10 % FCS,
HuH-7 stabil	DMEM, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 500 µg/ml Geneticin (G418), 2 mM L-Glutamin, 1 mM Sodium Pyruvat, 10 % FCS

Verwendete Agentien zur Erstellung von Dauerkulturen

Zellstamm	Einfriermedium
HuH-7 Wildtyp	DMEM, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Sodium Pyruvat, 20 % FCS, 10 % DMSO
HuH-7 stabil	DMEM, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 500 µg/ml Geneticin (G418), 2 mM L-Glutamin, 1 mM Sodium Pyruvat, 10 % FCS, 10 % DMSO

2.2.2.2 Transfektion von Zellen

Die Transfektion eukaryotischer Zellen wurde mit Hilfe des Effectene™ Transfection Reagent Kits durchgeführt, der auf dem Prinzip der Verwendung nicht-liposomaler Lipide basiert. Hierzu wird in einem ersten Schritt die DNA in einem definierten Puffersystem (*buffer EC*) durch die Zugabe eines kondensierenden Agens (*Enhancer*) komprimiert; ein DNA-Enhancer-Komplex entsteht. In einem weiteren Schritt werden die Lipide (*Effectene*) zugegeben, die den DNA-Enhancer-Komplex in Micellen verpacken. Durch die Zugabe von Medium wird die Reaktion gestoppt und der Ansatz direkt zu den Zellen gegeben. Die eigentliche Transfektion, das Einschleusen der Fremd-DNA in die Wirtszelle, findet durch die Fusion der Lipide mit der Zellmembran statt. Zur Etablierung der transienten wie auch der stabilen Transfektion von HuH-7 Zellen wurde zunächst eine Optimierung der Transfektionsparameter mit dem Reporter-Plasmid pGL2-control durchgeführt.

2.2.2.2.1 Stabile Transfektion

Stabil transfizierte HuH-7 Zellen ermöglichen die Durchführung von Signaltransduktionsanalysen im 96-Well-Format mittels Luciferase-Reportergen Test. Im Rahmen dieser Arbeit wurden HuH-7 Zellen stabil dem pCC-2-Luciferase-Reportergenkonstrukt transfiziert. Als Selektionsmarker diente der Vektor pcDNA 3.1 (-) Neo, der für das Resistenzgen Neomycin codiert. Dieser führt durch Zugabe von Geneticin (G418) zur Selektion von pcDNA 3.1 positiven Zellen. Als Kontrolle dienten HuH-7 Zellen, deren Transfektionsansatz keinen Selektionsmarkers enthielt. Für die Durchführung der stabilen Transfektion wurden die Zellen 16-24 h vor der Transfektion in einer Dichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen auf eine 100 x 20mm Kulturschale ausgesät. Vor Beginn der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 5 ml Medium in der Zellkulturschale vorgelegt. Die Transfektion wurde wie in der nachfolgenden Tabelle beschrieben durchgeführt.

Verwendetes Protokoll für stabile Transfektionen

Herstellung der Transfektionsansätze	
buffer EC	300 µl
Plasmid-DNA	12 µg
Enhancer	48 µl
Vortexen, Inkubation für 5 min bei RT, anschließend Zugabe von:	
Effectene	60 µl
Vortexen, Inkubation für 10 min bei RT, danach Zugabe von 4,6 ml Kulturmedium.	

Die Transfektionsansätze wurden anschließend in den Kulturschalen zu den Zellen gegeben und für den weiteren Versuchsverlauf immer bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium erstmalig gewechselt, nach weiteren 24 h wurde das Selektionsmedium (Kulturmedium + 500 µg/ml G418) zugegeben. Abgestorbene Zellen wurden durch regelmäßigen Wechsel des Selektionsmediums entfernt. Nach einer Dauer von etwa 14 Tagen Selektion waren die Kontrollzellen fast vollständig abgestorben und gewachsene Einzelklone wurden zur Vereinzlung trypsinisiert und in einer Konzentration von 200 Zellen pro Schale ausgesät. Einzelklone geeigneter Größe wurden mit einer Pipettenspitze in ein Well einer 96-Well-Platte überführt und bei einer Konfluenz von 70-90% in eine 24-Well-Platte transferiert. Abschließend wurden die Einzelklone im Luciferase-Reporter-Gen Test auf ihre Aktivität getestet und abschließend einem Test auf stabile Integration unterzogen.

2.2.2.2 Transiente Transfektion

Transiente Transfektionsexperimente dienen der *in vivo* Analyse der Signalweiterleitung mittels Luciferase-Reporter-Gen Test. HuH-7 Zellen wurden hierzu 24 h vor der Transfektion in eine 24-Well-Kulturplatte mit einer Dichte von 1,5 x 10⁴ Zellen pro Well ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Vor Beginn der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und je 0,5 ml Medium vorgelegt. Die Transfektion wurde wie in der anschließenden Tabelle beschrieben durchgeführt. Bei Kotransfektionen oder multiplen Transfektionen wurden die Vektoren in gleichen Verhältnissen zueinander eingesetzt. Als Positivkontrolle diente eine Transfektion mit dem Nicht-Reporter-Vektor pGL-2 control.

Verwendetes Protokoll für transiente Transfektionen

Herstellung der Transfektionsansätze (Ansatz für 1 Well einer 24-Well-Platte)	
buffer EC	100 µl
Plasmid-DNA	3 µg
Enhancer	4 µl
Vortexen, Inkubation für 5 min bei RT, anschließend Zugabe von:	
Effectene	4 µl
Vortexen, Inkubation für 10 min bei RT, danach Zugabe von 300 µl Kulturmedium.	

2.2.2.3 Stimulation von Zellen

Die in vitro Untersuchungen der Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung der Promotorkonstrukte pCC-2-luc und *hPER1*-luc führten, wurden mittels Reporter-Gen-Test, PCR sowie auf protein-biochemischer Ebene durchgeführt. Dies erforderte die vorherige Inkubation der Zellen mit stimulatorischen Substanzen und sind nachfolgend aufgeführt.

Verwendete Substanzen

Stimulanzien	Anbieter	Konzentration der Stammlösung / Lösungsmittel
Forskolin	Alexis Biochemicals, Grünberg, Germany	10 mM / DMSO
PMA	Alexis Biochemicals, Grünberg, Germany	1 mM / DMSO
<i>Sp</i> -5,6-DCI-cBiMPS	BioLog Lifescience Institute, Bremen, Germany	10 mM / DMSO
rh Interleukin-1 β	TEBU, Frankfurt a.M. (ReproTech Inc.), Germany	100 ng/l / H ₂ O
rh Interleukin-6	TEBU, Frankfurt a.M. (ReproTech Inc.), Germany	100 ng/l / H ₂ O
Inhibitoren	Anbieter	Konzentration der Stammlösung / Lösungsmittel
Anti-h-IL-1RI	TEBU, Frankfurt a.M. (ReproTech Inc.), Germany	100 μ g/ml / H ₂ O
Anti-h-IL-6R	TEBU, Frankfurt a.M. (ReproTech Inc.), Germany	500 μ g/ml / H ₂ O
BAY 11-7085	Alexis Biochemicals, Grünberg, Germany	10 mM / DMSO
Bisindolylmaleimid	Calbiochem, Bad Soden, Germany	10 mM / DMSO
Chelerythrin	Biomol, Hamburg, Germany	1 mM / DMSO
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany	1 mM / DMSO
KN-62	Biomol, Hamburg, Germany	1 mM / DMSO
Ly 294002	Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany	10 mM / DMSO
Neomycin	Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany	1 mM / DMSO
PD-98059	Alexis Biochemicals, Grünberg, Germany	100 mM / DMSO
<i>Rp</i> -8-CPT-cAMPs	BioLog Lifescience Institute, Bremen, Germany	100 mM / H ₂ O
Rottlerin	Biomol, Hamburg, Germany	100 mM / DMSO
SB-203586	Alexis Biochemicals, Grünberg, Germany	5 mM / DMSO
NF- κ B SN 50	Biomol, Hamburg, Germany	1 mg/ml / H ₂ O
Thapsigargin	Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany	1 mM / DMSO
Tyrphostin AG 490	Alexis Biochemicals, Grünberg, Germany	100 mM / DMSO
Wortmannin	Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany	10 mM / DMSO

Alle Substanzen wurden in Wasser oder DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für die Stimulation wurden Zellen 24 h vor der eigentlichen Stimulation ausgesät und unter Standardbedingungen über Nacht kultiviert. Stabil transfizierte Zellen wurden in 96-Well-Kulturplatten in einer Dichte von 8×10^4 Zellen pro Well., Wildtyp-Zellen in 24-Well-Platten in einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ ausgesät. Die Stimulatoren wurden in erwärmtem MEM-alpha Medium verdünnt und nach Entfernung des Kulturmediums zu den Zellen gegeben. Im Fall einer 96-Well-Platte betrug das Volumen $25 \mu\text{l}$, bei einer 24-Well-Platte variierte es je nach Länge der Inkubation zwischen 100 und $250 \mu\text{l}$. Die Stimulationszeit betrug durchschnittlich 4-6 h, in der die Zellen bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert wurden. Bei zusätzlicher Verwendung von Inhibitoren wurden diese in 25 bzw. $100 \mu\text{l}$ MEM-alpha verdünnt und für mindestens 20 min bei gleichen Bedingungen vorinkubiert. Der anschließende Stimulus wurde 6-fach konzentriert zugegeben. Jede Stimulation wurde im Normalfall in mindestens drei Wells parallel durchgeführt, wobei die Inkubation mit zusatzfreiem Medium MEM-alpha als Kontrolle diente.

2.2.2.4 Luciferase-Reportergen Test

Der Luciferase-Reportergen Test dient dem indirekten Nachweis der Expression von Genen. Das zu untersuchende Gen ist an ein Reportergen gebunden, das für Luciferase kodiert. Die Aktivität der Luciferase ist ein Maß für die Genexpression. Zur Bestimmung von Luciferase-Reportergen-Aktivität wurde die stabilisierte Luciferin-Lösung SteadyGlo® von Promega verwendet, der auf einer enzymkatalysierte Chemilumineszenz-Reaktion beruht.

Für die Luciferase-Reportergen Experimente wurden stabil transfizierten HuH-7 Zellen verwendet, die das pCC-2- oder *hPER1*-luc-Luciferase-Reportergen enthielten sowie HuH-7 Wildtyp-Zellen genutzt. Stabil transfizierte Zellen wurden in einer Dichte von 8×10^4 Zellen pro Well auf einer 96-Well-Kulturplatte mit klarem Boden und weißen Seitenwänden ausgesät. HuH-7 Wildtyp-Zellen wurden in einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Well in einer 24-Well-Kulturplatte ausgesät und wie unter 2.2.2.2 beschrieben transfiziert. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen (37°C , 5% CO_2) inkubiert und dem Experiment entsprechend stimuliert (Kapitel 2.2.2.3). Nach einer Stimulationszeit von maximal 6 h wurde das Medium entfernt und gleiche Mengen auf RT äquilibriertes MEM-alpha und Steady-Glo-Lösung zugegeben. Das Volumen betrug bei einer Platte mit 24-Well je $50 \mu\text{l}$, bei einer Platte mit 96-Well je $25 \mu\text{l}$. Die Kulturplatten wurden für 15-20 min mit 250 U/min bei RT geschüttelt. Hierbei erfolgte die Lyse der Zellwände und somit die Freisetzung der gebildeten Luciferase. Die Messung des emittierten Lichts erfolgte in einem automatischen 96-Well-Luminiszenzmeßgerät (LumiStar), wobei jedes Well 10 s gemessen wurde. Das gemessene Licht wurde in Relative Light Units (RLU) angegeben. Die Auswertung der Experimente wurde mit Hilfe einer LumiStar Excel-Maske durchgeführt und abschließend statistisch ausgewertet (siehe 2.5).

2.2.3 Standardmethoden im Umgang mit Bakterien

2.2.3.1 Kompetenzinduktion bei *E.coli*

Die Herstellung kompetenter Zellen basiert auf der Methode von NISHIMURA *et al.* (1990). Hierzu wurden 5 ml LB-Medium mit einer Bakterienkultur angeimpft und bei 37 °C über Nacht im Schüttler hochgezogen. Es wurden 1 ml dieser Übernachtskultur in einem Verhältnis 1:100 zu neuem LB-Medium gegeben und bei 37 °C weitergeschüttelt (200 rpm) bis die Zelldichte einen Wert von $OD_{548} = 0.55$ erreicht hatte. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis gestellt, sedimentiert (10 min, 1500 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem Medium A resuspendiert. Nach weiterer Zugabe von 5 ml Medium B wurde diese Zellsuspension in 100 µl Aliquots bei – 80 °C eingefroren.

Verwendete Medien

Luria-Bertani (LB)-Medium	1,0 % Caseinhydrolysat 0,5 % Hefe-Extrakt 0,5 % NaCl
Medium A	LB-Flüssigmedium mit Zusatz von 10 mM $MgSO_4$ 0,2 % Glukose
Medium B	LB-Flüssigmedium mit Zusatz von 36 % Glycerin 12 % Polyethylenglykol (PEG 8000) 12 mM $MgSO_4$

2.2.3.2 Ligation

Die Ligation beruht auf dem Spalten von Plasmid-DNA-Ringen, sog. Klonierungsvektoren, durch Restriktionsnukleasen, wodurch an den Enden kurze einzelsträngige Abschnitte entstehen. An diesen Enden können nun DNA-Fragmente eines anderen Organismus, die mit derselben Restriktionsnuklease geschnitten wurden, eingebaut werden. DNA-Ligasen katalysieren das Schließen des Plasmid-Ringes indem sie unter ATP-Hydrolyse Phosphodieseter-Bindungen herstellen.

Für die Ligation wurde standardmäßig folgender Ansatz pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert:

Ligationsansatz	1 ng Vektor 3-10 ng Insert 5 x Ligase Puffer 1 µl Ligase ddH ₂ O Gesamtvolumen 10 µl
-----------------	--

2.2.3.3 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E.coli*-Zellen

Für die Transformationsexperimente wurde ein 40 µl-Aliquot der auf – 80°C gelagerten kompetenten Zellen vorsichtig auf Eis aufgetaut und mit einer definierten Menge des Ligationsansatzes (10 µl) versetzt. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C, bei dem die Plasmid-DNA in die Zellen eingebracht wurde. Die Zellsuspension wurde für 2 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden 200 µl vorgewärmtes SOC-Medium in ein Reagenzröhrchen abgefüllt, der Transformationsansatz zugegeben und für 45 min bei 37 °C und 1000 rpm im Thermomixer geschüttelt. Je 100 µl der Suspension wurden auf zwei mit Ampicillin [100 µg/ml] versetzten LB-Platten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nur erfolgreich transformierte Bakterien, die den ampicillinresistenz-vermittelnden Vektor enthielten, konnten somit wachsen.

Verwendete Medien

SOC-Medium	2 % Caseinhydrolysat 1 % Hefe-Extrakt 10 mM NaCl 10 mM MgSO ₄ 10 mM MgCl ₂ 20 mM Glucose, steril filtriert Das Medium wurde vor der Zugabe der Glukose autoklaviert, der pH-Wert mit 5 N NaOH auf 7,0 eingestellt
------------	--

2.2.3.4 Selektion von Einzelklonen

Es wurden je 3 ml LB-Medium in ein Reagenzröhrchen abgefüllt und mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml versetzt. Eine einzelne Bakterienkultur wurde mit einer Pipettenspitze von einer LB-Platte isoliert und in das Bakterienmedium überführt. Das Röhrchen wurde über Nacht bei 37 °C und 220 rpm im Wärmeschüttler inkubiert. Die Auswahl der Klone richtete sich nach ihrem Zustand; sie sollten einzelstehend und ohne Kolonien sein.

2.2.3.5 Restriktion von Nukleinsäuren

Bei der enzymatischen Spaltung von DNA handelt es sich um eine spezifische Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung auf beiden Strängen. Zur Restriktion von Plasmid-DNA wurden Restriktionsendonukleasen und entsprechende Puffer nach den Angaben des Herstellers verwendet. Pro µg DNA wurden 1 U des Enzyms eingesetzt und bei 37 C bis zum vollständigen Umsatz inkubiert.

2.2.3.6 Klonierung von DNA

Bei der Klonierung wird ein Genfragment in einen Plasmidring eingesetzt und dieser in ein Bakterium geschleust. Die Bakterien vermehren bei ihrer Replikation das eingeschleuste Plasmid inklusive des darin enthaltenen Genfragments mit.

Hierfür wird eine Ligation durchgeführt (siehe 2.2.3.2), gefolgt von einer Transformation (siehe 2.2.3.3). Geeignete Klone werden gepickt (siehe 2.2.3.4), in einer Übernachtskultur vermehrt und die Plasmid-DNA aus den Bakterien mittels einer Minipräparation gewonnen (siehe 2.3.1.1). Die Plasmid-DNA wird anschließend durch Restriktionsendonukleasen verdaut (siehe 2.2.3.5) und mittels Gelelektrophorese auf die korrekte Größe getestet (siehe 2.3.3.1).

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Standardmethoden zur Isolierung von Nukleinsäuren

2.3.1.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die hier verwendete Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (BIRNBOIM & DOLY 1979) und wurde mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits durchgeführt.

Hierzu wurde eine Bakterienkultur in 5 ml LB-Medium, versetzt mit Ampicillin, über Nacht im Warmluftschüttler (220 rpm) bei 37°C kultiviert. Es wurden 2 ml dieser Übernachtskultur durch Zentrifugieren für 30 sec bei 12.000 x g und RT sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 250 µl Puffer A1 resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl alkalischem, SDS-haltigem Puffer A2 kommt es zur alkalischen Lyse der Bakterien und dem Abbau der RNA. Im folgenden Schritt wurden 300 µl Puffer A3 hinzupipettiert, wodurch Proteine wie auch chromosomale DNA gefällt wurden. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C wurde der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, auf eine NucleoSpin Säule aufgetragen und erneut zentrifugiert (1 min, 12.000 x g, RT). Die Plasmid-DNA ist nun an die Silikamembran der Säulen gebunden. Kontaminationen und Rückstände wurden durch das Waschen mit 600 µl ethanolhaltigem Puffer A4 und einer anschließenden Zentrifugation für 1 min bei 12.000 x g und RT entfernt. Zur Eluierung der reinen Plasmid-DNA wurde die Membran mit alkalischem Puffer AE für 2 min bei RT inkubiert und anschließend 1 min bei 12.000 x g und RT zentrifugiert; die Lagerung erfolgte bei – 20°C.

2.3.1.2 Präparation von Endotoxin-freier Plasmid-DNA

Die Präparation von Endotoxin-freier Plasmid-DNA wurde unter der Verwendung des Endo Free™ Plasmid Kits durchgeführt. Das Prinzip dieses Kits basiert auf einer modifizierten Art der alkalischen Lyse, sowie dem anschließenden Binden der Plasmid-DNA an ein spezielles Anionen-Austausch-Säulenmaterial. Die Plasmid-DNA wird in einem weiteren Schritt mit einem Puffer hoher Salzkonzentration eluiert und anschließend durch eine Isopropanol Präzipitation entsalzt.

Hierzu wurde eine Vorkultur von 5 ml angesetzt, 8 h im Wärmeschüttler (220 rpm) bei 37°C inkubiert und 2 ml davon in 25 ml LB-Medium, mit Ampicillin versetzt, gegeben. Die Übernachtskultur wurde durch Zentrifugation für 15 min bei 6.000 x g und +4°C pelletiert, der Überstand verworfen und in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Es erfolgte die alkalische Lyse durch Zugabe von 4 ml Lysispuffers P2 und einer anschließenden Fällung der Proteine und chromosomaler DNA durch Zugabe von 4 ml Neutralisationspuffer P3. Nach Zentrifugation für 30 sec bei 20.000 x g und 4°C wurde der Plasmid-DNA-haltige Überstand nochmals abzentrifugiert (15 min, 20.000 x g, 4°C) und auf einen zuvor mit 4 ml Puffer QBT equilibrierten „tip“ gegeben; der Durchfluß erfolgt aufgrund der Schwerkraft. Rückstände wurden durch zweimaliges Waschen mit je 10 ml Waschpuffer QC entfernt. Die reine Plasmid-DNA wurde mit 5 ml Puffer QF eluiert und anschließend durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol RT präzipitiert und pelletiert (30 sec, 15.000 x g, 4°C). Das DNA-Pellet wurde mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in einer definierten Menge Puffer (TE pH 8,0 oder 10 mM Tris-HCl pH 8,5) gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei – 20°C gelagert.

2.3.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde der NucleoSpin® Extract Kit verwendet. Sein Prinzip beruht auf der Wirkung von Silica-Membran in den NucleoSpin Extract Säulen und dem Einsetzen von Puffern mit chaotropischen Salzen (VOGELSTEIN & GILLESPIE, 1979).

Das Gelstück, welches das gewünschte DNA-Fragment enthielt, wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten, gewogen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von Puffer NT1 (300 µl pro 100 mg Gel) und Inkubation bei 50°C wurde das Gelstück unter regelmäßigem Vortexen gelöst. Diese Mischung wurde in einem weiteren Schritt auf die NucleoSpin Extract Säulen gegeben, für 1 min bei 8.000 x g und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Hierbei kommt es zu einer selektiven Bindung der Nukleinsäure. Agarose sowie EtBr, Proteine und Salze verbleiben in Lösung und wurden durch nachfolgende Waschschritte mit ethanolhaltigem Puffer NT3 (1 x 600 µl, 1 x 200 µl) entfernt. Die DNA wurde durch Zugabe von 50 µl alkalischem Puffer NE (5 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei – 20°C gelagert.

2.3.1.4 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Das Prinzip des Kits beruht auf einer Silikasäulenchromatographie/-zentrifugation.

In einem ersten Schritt wurden die Zellen einer 6-Well-Kulturschale nach Waschen mit PBS durch Zugabe von 175 µl Puffer RLN und 600 µl RLT lysiert und anschließend mechanisch homogenisiert. Durch die Verwendung des Guanidin Isothiocyanat (GITC)-haltigen Puffers herrschen hohe denaturierende Bedingungen, die ein RNase freies Milieu schaffen und so die Isolierung intakter RNA gewährleisten. Zur Herstellung geeigneter Bindungsbedingungen wurde 430 µl Ethanol zugegeben. Des Weiteren wurden die Proben auf jeweils eine RNeasySpin Säule gegeben und zentrifugiert. Hierbei bindet die RNA an die Silikamembran, die abzentrifugierte flüssige Phase wurde verworfen. Anschließende Waschschrte mit 700 µl Puffer RW1 und 2 x 500µl Puffer RPE entfernten sehr effizient noch vorhandene Verunreinigungen. In einem letzten Schritt wurde die total RNA durch Zugabe von RNase freiem ddH₂O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei – 80°C gelagert. Die genaue Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Verwendete Puffer und Lösungen

RLN	500 µl Tris-HCL, 1 M, pH 8,0 700 µl NaCl, 2 M 15 µl MgCl ₂ , 1 M 50 µl Nonidet P-40 optional: 1000 U/ml RNasine (2 µl) 1 mM DTT (10 µl)
RLT	80 µl Mercatoethanol 1 % 7920 µl RLN

2.3.2 Standardmethoden zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch durch eine Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt und mit dem Spektralphotometer DU[®] 640 der Firma Beckmann durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Messung einer verdünnter DNA- oder RNA-Lösungen bei 260 und 280 nm in einer Quarzküvette. Der OD-Wert, das heißt das Verhältnis von 260/280 nm, kann Auskunft über die Reinheit der Nukleinsäurepräparation geben. Lösungen mit OD-Werten von > 2,0 für RNA und > 1,8 für DNA können als rein betrachtet werden.

Die Nukleinsäurekonzentration c ergibt sich aus der im Spektralphotometer ermittelten optischen Dichte (OD_{260}) durch folgende Beziehung:

$$c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = OD_{260} \times \varepsilon \times V$$

V = Verdünnungsfaktor der wässrigen Nukleinsäurelösung

ε = Extinktionskoeffizient

ε für ssRNA = 1,04

ε für dsDNA = 0,05

2.3.3 Standardmethoden der Gelelektrophorese (nach Meyers et al., 1976)

Das Prinzip der Gelelektrophorese beruht auf der Tatsache, daß jedes in einem Nukleinsäuremolekül enthaltene Nukleotid eine eigene negative Ladung enthält. Durch die Verwendung von relativ porösen Agarosegelen ist es möglich DNA sowie RNA mittels Elektrophorese der Größe nach aufzutrennen.

2.3.3.1 DNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten zu präparativen oder analytischen Zwecken erfolgte in nativen horizontalen Agarosegelen. Die Gele wurden frisch mit $1 \times$ TAE angesetzt und mit EtBr in einer Konzentration von $1 : 1000000$ versetzt. Die Agarosekonzentration variierte je nach erwarteter Größe des Fragments zwischen 0,8 % und 2,0 %. Vor Beladen des Gels wurden die Proben mit $1/5$ Vol. DNA-Blaumarker versehen und aufgetragen. Als Größenvergleich wurde in eine Spur ein DNA-Längenstandard (1 kbp- bzw. 100 bp-Leiter) geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 80 Volt. Durch das frühe Zugeben von EtBr konnte das Gel direkt nach dem Lauf unter dem UV-Transilluminator betrachtet werden. Das so sichtbar gemachte DNA-Bandenmuster wurde mittels der Dokumentationssysteme von Kodak EDAS 290 System mit Software Kodak 1D v.3.5.0 und Gel Doc 2000 System mit Software QuantityOne® 4.0.1 fotografiert und archiviert.

Verwendete Puffer und Lösungen

50 x TAE (Stammlösung)

2 M Tris
100 mM EDTA
1 M Essigsäure

5 x DNA-Blaumarker

70 % Glycerin
10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA
0,05 % (w/v) Bromphenolblau

2.3.4 Standardmethoden der Polymerasekettenreaktion (nach Saiki et al., 1988)

Die Polymerasekettenreaktion oder *polymerase chain reation* (PCR) stellt eine *in vivo* Standardmethode dar, durch die spezifische DNA-Abschnitte selektiv und exponentiell amplifiziert werden können. Die Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente wiederum ist Voraussetzung für anschließende Schritte wie Klonierung oder Sequenzierung.

2.3.4.1 Standard-PCR

Der Reaktionsansatz für eine Standart-PCR mit einem Gesamtvolumen von 25 µl war wie folgt zusammengesetzt:

10 %	10 × PCR-Puffer (inklusive MgCl ₂)
200 nM	Oligonucleotid Primer (Sense und Antisense)
200 mM	dNTP-Mix (je 200 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
1-100 ng	DNA-Matritze (genomische DNA, cDNA oder Plasmid)
1U	Taq DNA-Polymerase
2 %	DMSO
ad 100 %	ddH ₂ O

Eine Standard-PCR wurde nach folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

1. Erst-Denaturierung	95°C	3‘	1 Zyklus
2. Denaturierung	95°C	20“	35 Zyklen
3. Oligonukleotidanlagerung	56-62°C	30“	
4. Elongation (Verlängerung)	72°C	1‘	
5. End-Elongation	72°C	7‘	1 Zyklus
6. Kühlen	4°C	∞	

Für die PCR-Experimente wurde das System GeneAmp System 2400 der Firma Perin Elmer verwendet. Die Oligonukleotid Primer sowie die Einzelparameter Annealingtemperatur (Oligonukleotidanlagerung) und Zyklenzahl variierten je Untersuchung und wurde für das jeweilige Experiment in initialen PCR-Reaktionen optimiert.

2.3.4.2 *Semi-quantitative RT-PCR*

Im Rahmen von Studien zur Bestimmung der Genexpression in Zelllinien wurde eine semi-quantitative RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurden Standard-PCR-Ansätze unter Einsatz von cDNA-Erststrang und den spezifischen Oligonukleotiden North1-for und Chem2-rev pipettiert. Die Annealingtemperatur lag bei 56° C; es wurden Zyklenzahlen von 20, 25, 30, 35 und 40 Zyklen gewählt. Zur semi-quantitativen Bestimmung der Genexpression wurden 10µl des jeweiligen PCR-Ansatzes in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend dokumentiert (siehe 2.3.3.1). Die Auswertung des Areal der detektierten Banden des zu untersuchenden cDNA-Fragments erfolgte mit dem Programm QuantiScan und wurde als relative Fläche angegeben (siehe 2.5).

2.3.4.3 *Real-Time PCR*

Real-Time PCR ist eine genaue Methode zur quantitativen Bestimmung spezifischer DNA- und RNA-Mengen. Hierbei kann online mittels Fluoreszenzmessung die Menge des gebildeten PCR-Produktes verfolgt werden. Im Anschluß kann die ursprünglich in die Reaktion eingesetzte Menge Transkript berechnet werden. Das Prinzip basiert auf der Verwendung zweier spezifischer Primer und einer spezifischen Sonde. Diese besitzt eine stets höhere Schmelztemperatur als die Primer und ist am 5'-Ende mit einem Reporter (Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff) und am 3'-Ende mit einem Quencher (Quencher-Rhodamin-Derivat) markiert. Ist die Sonde intakt, so findet zwischen Reporter und Quencher ein Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) statt. Die Energie des emittierten Lichtes ist dadurch abgeschwächt und nur als geringes Signal detektierbar. Wird die Sonde jedoch zwischen Reporter und Quencher durch die 5' - 3'-Nukleaseaktivität der Taq Polymerase hydrolysiert, fällt die räumliche Nähe von Quencher und Reporter weg. Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer wird unterbrochen und der Farbstoff beginnt zu fluoreszieren. Die Fluoreszenz, die während jedes Zyklus freigesetzt wird, ist proportional zur Anzahl der in diesem Zyklus hergestellten Fragmente. So ist der Rückschluß auf die Ausgangsmenge an Transkript möglich.

Ein Real-Time PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl war wie folgt zusammengesetzt:

12,5 µl	2 x TaqMan [®] Universal PCR MasterMix
200 nM	Oligonukleotid (200 nM je Oligonukleotid)
200 nM	Sonde (5' - und 3' -markiertes Oligonukleotid)
1,0 µl	DNA-Matrize (Template)

Für die Bestimmung der Transkriptionsrate von CCL15 in humanen Geweben und Zelllinien wurden als Oligonukleotide Chem2-forward und Chem2-reverse genutzt, als Sonde Chem2 probe. Für alle Experimente wurden aliquotierte cDNA-Stammlösungen definierter Konzentration verwendet. Als

endogene Amplifikationskontrolle zum Abgleichen der eingesetzten cDNA-Mengen dienten Oligonukleotide und Sonde für das sogenannte Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH). Die Real-Time PCR-Experimente wurden mit dem Gerät TaqMan™ (7700 Sequence DETECTOR; ABI Prism) der Firma Perkin Elmer durchgeführt.

Das zur Analyse verwendete Temperaturprogramm gestaltete sich wie folgt:

1. Uracil-N-Glykosylase-Reaktion	50°C	2 min	1 Zyklus
2. Erst-Denaturierung	95°C	10 min	1 Zyklus
3. Denaturierung	95°C	15 sec	
Oligonukleotidanlagerung und Elongation (Verlängerung)	59°C	45 sec	45 Zyklen
4. Reaktionsende	25°C	∞	1 Zyklus

2.3.4.3.1 Quantifizierung der endogenen Expression von CCL15 in humanen Geweben und Zelllinien

Die Quantifizierung der endogenen Expression in humanen Geweben und Zelllinien erfolgte durch den Abgleich mit einem definierten CCL15-Standard und einer anschließenden absoluten Quantifizierung. Hierbei wurden Standardreihen von Plasmid-DNA bekannter Kopienzahl, sowohl für CCL15 als auch für die endogene Kontrolle GAPDH, durch Verdünnungsreihen erstellt. Zur Berechnung der endogenen CCL15-Expression wurde anschließend die experimentell ermittelte Transkriptzahl von CCL15 durch die der endogenen Kontrolle GAPDH dividiert.

2.3.4.3.2 Quantifizierung der induzierten endogenen Expression von CCL15 in HuH-7 Zellen

Für die quantitative Auswertung der endogenen CCL15-Expression von stimulierten und unstimulierten Zellen wurde ein Stimulationsfaktor ermittelt, der als Maß für die Stimulation dient. Hierbei wurde zur Berechnung des Stimulationsfaktors in einem ersten Schritt $\Delta\Delta C_T$ nach folgender Formel erstellt:

$$\Delta\Delta C_{T\text{ CCL15}} = (\Delta C_{T\text{ CCL15 unstimuliert}} - \Delta C_{T\text{ GAPDH unstimuliert}}) - (\Delta C_{T\text{ CCL15 unstimuliert}} - \Delta C_{T\text{ GAPDH unstimuliert}})$$

C_T -Wert (*threshold cycle*) stellt hierbei die Zyklenzahl dar, die notwendig ist, um einen festgelegten Schwellenwert eines Fluoreszenzsignals zu überschreiten. Da während einer PCR-Reaktion im Idealfall in jedem Zyklus die doppelte Menge an Produkt entsteht, läßt sich der Stimulationsfaktor wie folgt berechnen:

$$\text{Stimulationsfaktor} = 2^{\Delta\Delta C_T}$$

2.3.5 Standardmethoden im Umgang mit DNA und RNA

2.3.5.1 Sequenzieren von DNA

Die durchgeführte Bestimmung der DNA-Nukleotidsequenz basiert auf einer modifizierten Form des enzymatischen Kettenabbruchverfahrens nach SANGER *et al.* (1977). Grundlage dieses Verfahrens ist eine PCR-Reaktion, in welcher der zu sequenzierende DNA-Strang mittels einer DNA-Polymerase und unter Verwendung komplementärer Oligonukleotide linear amplifiziert wird. Zusätzlich zu den für die Neusynthese verwendeten Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) werden dem Ansatz ddNTP's (2',3'-Dideoxynukleosid-5'-Triphosphat) beigefügt. Der Einbau der ddNTPs in den Neustrang während der Extension resultiert im Abbruch der Kettenreaktion. Grund hierfür ist das Fehlen der für die Kettenverlängerung benötigten 3'-Hydroxyl-Gruppe. Die Wiederholung dieses Vorganges führt zur Akkumulation der Abbruchprodukte im Reaktionsansatz. Die Markierung jedes ddNTP mit einem Farbstoff eines bestimmten Fluoreszenzspektrums ermöglicht eine parallele automatisierte Detektion der spezifischen Produkte in der Kapillarelektrophorese.

2.3.5.1.1 Sequenzreaktion

Für die DNA Sequenzierung wurde der ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Gereinigte DNA-Proben wurden nach dem angegebenen Schema sequenziert.

Ein Standard-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen

8 µl	Dye Terminator Sequencing Ready Reaction Mix
1 µl	Oligonukleotid (10 pmol/µl)
x µl	Matrizen-DNA (DNA in ng=Basenpaaranzahl/7.5)

Das verwendete Temperaturprogramm war wie folgt konzipiert

1. Denaturierung	96°C	10 sec	
2. Oligonukleotidanlagerung	45-60°C	5 sec	
3. Elongation (Verlängerung)	60°C	4 min	25 Zyklen
4. Kühlen	4°C		

2.3.5.1.2 Aufreinigung der Sequenzierproben durch DNA-Präzipitation

Die Ansätze wurden nach Ablauf des Temperaturprogrammes mit ddH₂O auf 100 µl Endvolumen aufgefüllt. Für die Fällung wurden 1/15 Vol. 2 M NaAc sowie 2,5 Vol. eiskalter 96% EtOH zu der Nukleinsäure-Lösung gegeben und diese für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde für 15 min bei 4°C und 15.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit eiskaltem 75% EtOH gewaschen und für 3 min Vakuum getrocknet.

Für die Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese-Sequencer (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, ABI) wurden die Proben in formamidhaltigem TSR-Reagenz („template supression reagent“, ABI) gelöst, bei 95° C für 2 min denaturiert und auf Eis gestellt. Die Proben wurden mit einer Injektionszeit von 30 sec auf das Kapillatgel aufgetragen und bei einer Spannung von 15 kV und einer Temperatur von 50 C elektrophoretisch aufgetrennt.

2.3.5.2 cDNA-Synthese (Erststrangsynthese)

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Fähigkeit der Reversen Transkriptase, mRNA als Matrize zu verwenden und so eine komplementäre DNA-Kopie von dem vorhandenen Stück herzustellen. Die Transkriptase benötigt hierfür spezifische, an die RNA gebundene Primer (Starteroligonukleotide), um ihre Synthese beginnen zu können.

Vorab wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, um eventuell noch vorhandene störende DNA zu eliminieren. Hierfür wurde die zuvor lyophilisierte RNA in 7 µl ddH₂O gelöst und 1 µl 10 x DNase I Reaktionspuffer, 1 µl RNAsin sowie 1 µl DNase I zugegeben. Der Ansatz wurde 10 min bei 37°C inkubiert, 1 µl 25 mM EDTA zugegeben, weitere 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt.

Für die eigentliche cDNA-Synthese wurden in einem ersten Schritt zu dem vorhandenen Ansatz 250 ng Random Primer zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 10 min. bei 72°C denaturiert und auf Eis gestellt, hierbei kam es zur Anlagerung der Oligonukleotide an die RNA. Im nächsten Schritt wurden jeweils 4 µl 5 x Erststrang-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP's und 0,5 µl RNAsin zugegeben und für weitere 2 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase (Superscript) zugegeben und bei 42°C für weitere 60 min inkubiert. In diesem Schritt kam es zur Reversen Transkription und so zur cDNA-Synthese. Nach Hitzedenaturierung des Enzyms war die cDNA-Synthese abgeschlossen und die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Western-Immunoblot

Zum Nachweis intrazellulärer Proteine wie Transkriptionsfaktoren oder Proteinkinasen wurde das Verfahren des Western-Immunoblot genutzt. Das Prinzip beruht auf der Übertragung der in einem Gel aufgetrennten Proteine auf einen geeigneten Trägerfilter, z.B. Nitrozellulose. In einem weiteren Schritt werden ausgewählte Proteine mit einem Antikörper markiert, der an ein Enzym, einen Fluoreszenzfarbstoff oder ein radioaktives Isotop gekoppelt ist. Nach Zugabe des Zweitantikörpers kann durch unterschiedliche Detektionsmethoden ein spezifisches Molekül im Gel bzw. auf der Membran nachgewiesen werden.

2.4.1.1 Probenvorbereitung

Für Western-Blot Analysen wurden HuH-7 Wildtyp-Zellen 16-24 h vor dem eigentlichen Experiment in einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Well in eine 24-Well-Kulturplatte ausgesät. Am Tag der Probengewinnung wurden die Zellen entsprechend des Experimentes stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde der Überstand entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und durch die Zugabe von 100 μ l 2 x Probenpuffer lysiert. Die Proben wurden anschließend mit Ultraschall behandelt (12 x für 12 sec bei 10-12 W), wo hochmolekulare DNA zerstört wird. Die Denaturierung der Proteine erfolgte bei 70°C für 10 min. Nach abschließender Abkühlung auf Eis wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 C gelagert.

Verwendete Puffer und Lösungen

2 x Probenpuffer	5 ml LDS Sample Puffer (Invitrogen)
	0,5 ml DDT 1M
	4,5 ml ddH ₂ O

2.4.1.2 SDS-Page (Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese)

Das Prinzip der SDS-Gelelektrophorese beruht auf der Verwendung des stark negativ geladenen Detergenz SDS. Dieses denaturiert die Proteine in einem ersten Schritt und kann anschließend an die hydrophoben Regionen der Proteinmoleküle binden. Die Proteine entfalten sich so zu gestreckten Polypeptidketten, gelöst aus ihren Assoziationen mit anderen Proteinen oder Lipiden. Das angelagerte SDS verleiht dem Komplex eine negative Ladung, wobei die Zahl der Dodecylsulfat-Moleküle ungefähr der Länge der Peptidkette proportional ist. Meist wird noch eine reduzierende Substanz, die alle Disulfidbrücken im Protein spaltet, zugegeben. Während der Elektrophorese wandern die negativ

geladenen Proteine alle in Richtung der positiven Elektrode, ihre Anordnung entspricht ihrer molaren Masse.

In den durchgeführten Experimenten wurden Bis-Tris gepufferte Polyacrylamid-Gradientengele (Invitrogen) verwendet, die in eine XCell Sure Lock Gelkammer (Invitrogen) eingespannt wurden. Das innere Pufferreservoir wurde mit ca. 200 ml Laufpuffer gefüllt und mit 500 µl Antioxidant versehen. Die Zugabe des Antioxidants zu der Kathode soll eine Reoxidation reduzierter Proteine sowie die Oxidation anderer Aminosäuren verhindern. Die Geltaschen wurden mit Laufpuffer gespült und 10 µl der zu untersuchenden Proben aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte für 35 min bei 200 Volt, die fertigen Gele wurden in Transferpuffer gelagert.

Verwendete Puffer und Lösungen

Laufpuffer (für Bis-Tris Gele)	50 ml	20 × NuPAGE Running Buffer (MES/SDS Puffer)
	950 ml	ddH ₂ O
Größenmarker		Prestained Protein Marker (NEB)

2.4.1.3 Transfer der Nukleinsäure

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF Membran wurde mittels *Wet Blot*-Verfahren durchgeführt und verwendet das XCell II Blot Module (Invitrogen). Hierfür wurde die Membran und das Polyacrylamidgel zwischen je zwei zuvor in Transferpuffer äquilibrierte Schwammtücher gelegt. Das als *Blot-Sandwich* bezeichnete "Paket" wurde in die Blotkammer eingespannt und diese mit 800 ml Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei konstant 30 Volt.

Verwendete Puffer und Lösungen

Transferpuffer (für Bis-Tris Gele)	50 ml	20 × NuPAGE Transfer Buffer (NP006-1)
	1 ml	NuPAGE Antioxidans
	200 ml	Methanol
	749 ml	ddH ₂ O

2.4.1.4 Detektionsreaktion

Es wurde das Detektionssystem SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate (PIERCE) verwendet, dessen Nachweisreaktion auf einer Chemilumineszenz beruht. Das bedeutet, daß ein Molekül, in diesem Fall Luminol, in einer chemischen Reaktion in einen energetisch höheren Zustand gehoben wird, anschließend in seinen Grundzustand zurückfällt und dabei Licht emittiert. Dieser Vorgang kann durch unmittelbares Auflegen eines Röntgenfilms dokumentiert werden. Der hier

verwendete Zweitantikörper ist Meerrettich-Peroxidase konjugiert und katalysiert unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol.

Für die Detektionsreaktion wurden in einem ersten Schritt methanolische Rückstände des Transfers entfernt, indem die Membran zweimal für 5 min in 1 x TBS-T gewaschen wurde. Durch die anschließende Inkubation für eine Stunde in Roti-Block kam es zur Absättigung überschüssiger Proteinbindungsstellen der Membran. Die Membran wurde in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und über Nacht mit dem Erstantikörper bei 4 °C (routierend 20-50 rpm) inkubiert. Nach Entfernen der Antikörperlösung erfolgte ein dreimaliges Waschen für je 5 min mit 1 x TBS-T und eine Inkubation mit dem Zweitantikörper für 1 h. Es folgten weitere fünf Waschschrte für je 5 min mit 1 x TBS-T. Alle Schritte erfolgten unter permanentem Schwenken. Für die anschließende Detektionsreaktion wurde die Membran mit der Proteinseite nach oben auf eine handelsübliche Haushaltsfolie gelegt und für 1 min mit 1,5 ml frisch angesetzten Detektionsreagenz inkubiert. Anschließend wurde die Membran luftblasenfrei in die Folie eingewickelt und ein Röntgenfilm (CL-X Posure, Pierce) aufgelegt. Die Exposition betrug zwischen 1 und 120 Minuten.

Verwendete Puffer und Lösungen

10 × TBS (tris-gepufferte Kochsalzlösung)	24,2 g Tris 80,0 g NaCl einstellen des pH-Wertes mit 25 % HCl auf 7,6 auffüllen mit ddH ₂ O auf 1000 ml
1 × TBS-Tween	100 ml 10 × TBS 0,5 ml Tween-20 900 ml ddH ₂ O

2.4.2 Radioimmunotest (Radioimmunoassay (RIA))

Der verwendete Radioimmunoassay dient dem Nachweis von CCL15-Protein aus dem Zellüberstand und basiert auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung. Hierbei konkurriert radioaktiv markiertes CCL15 mit der nativen Form des Zellüberstands um Bindungsstellen eines synthetisch hergestellten CCL15-Antikörpers. Je mehr CCL15 in den Proben vorhanden ist, desto weniger markiertes CCL15 kann an den Antikörper binden. Somit bedingt eine hohe Konzentration von nativem CCL15 eine niedrig gemessene Radioaktivität und umgekehrt.

2.4.2.1 Probengewinnung und -aufbereitung

Für die Probengewinnung wurden HuH-7 Zellen in einer 75 cm² Kulturflasche ausgesät und bei einer Konfluenz von 90% mit IL-1 α [1 ng/ml] und IL-6 [100 ng/ml] für 30 min, 1, 2, 4 und 8 h inkubiert. Zu

den jeweiligen Zeitpunkten wurden 5 ml Zellüberstand entnommen und zur Stabilisierung mit 1M Essigsäure versetzt. Als Kontrolle diente der Überstand unstimulierter Zellen. Bevor die Proben im RIA eingesetzt werden konnten, mußten diese in einem Aufbereitungsschritt entsalzt werden. Hierfür wurden Reverse Phase (RP)-Säulen (Sep-Pack-Cartiges, C18) genutzt, die mit 100% Methanol vorequillibriert und anschließend mehrmals gewaschen wurden (2x Puffer A, 1x Puffer B, 3x Puffer A). Anschließend wurden die Proben (5 ml), verdünnt mit 5 ml Puffer A, auf die Säule gegeben, wobei es zur Bindung der Proteine an das Säulenmaterial kommt. Durch Zugabe von 10 ml Puffer B werden die Proteine von der Säule eluiert. Das Eluat wird in einem abschließenden Schritt lyophilisiert und nachfolgend mittels RIA auf den Gehalt an CCL15-Protein analysiert.

2.4.2.2 Antigen-Antikörper-Komplexbildung

Für die Antigen-Antikörper-Komplexbildung wurden die lyophilisierten Proben in 100 μ l RIA-Puffer gelöst und mit jeweils 100 μ l Antikörper und radioaktiv markiertem CCL15 (Tracer) versetzt. Parallel wurde für die Quantifizierung der Proben eine Standardreihe des synthetisch hergestellten CCL15 (10305 Da) erstellt, die einen Konzentrationsbereich von 100 ng/100 μ l bis 0,015 ng/100 μ l umfaßt. Die einzelnen Verdünnungen wurden ebenfalls mit je 100 μ l Antikörper und Tracer versetzt. Als Maß für die totale Bindung, wurden 100 μ l Antikörper mit 100 μ l Tracer und 100 μ l RIA-Puffer versetzt (Positivkontrolle). Als Negativkontrolle, bei der keine spezifischen Bindungen auftreten, wurden 200 μ l RIA-Puffer zu 100 μ l Tracer gegeben. Die maximale Radioaktivität wurde durch die Verwendung von 100 μ l Tracer [10000 cpm /100 μ l] bestimmt. Die Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgte über Nacht bei 4°C.

2.4.2.3 Fällungsreaktion

Für die Fällung des Antigen-Antikörper-Komplex wurden 500 μ l Fällungsreagenz zu den Versuchsansätzen gegeben, durch Vortexen gemischt und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei 3000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand bis kurz oberhalb des Pellets abgesaugt. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 3000 rpm, 4°C) wurde der Überstand vollständig abgesaugt und die Radioaktivität der Proben im gamma-Counter ermittelt.

Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer A:	0,1 % TFA
Puffer B:	80 % Acetonitril 0,1 % TFA

Stammlösung für Standardreihe:	10 µg CC-2 (10305 Da, synthetisch hergestellt) gelöst in 100 µl H ₂ O
50 mM Natriumphosphatpuffer	Lösung 1: 8,9g /1Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O Lösung 2: 6,8 g/l NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O Lösung 1 und 2 mischen, bis pH 7,4 erreicht ist
RIA-Puffer.	200 ml 50mM Natriumphosphatpuffer 1g BSA (Sigma, RIA grade) 50 mg Tween20 40 mg Natriumazid
Antikörper	K228 t12, 1:1000 verdünnt in RIA-Puffer
Tracer	mit Jod125 radioaktiv markiertes CCL15 (synth. 10305 Da)
Fällungsreagenz:	Donkey-anti-Rabbit (Immundiagnostik)

2.5 Computer, Programme und Statistik

Für die Recherche von Sequenzinformation wurde der öffentlich zugängliche Server des National Center for Biotechnology Information (NCBI) und der BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool, ALTSCHUL *et al.*, 1997) genutzt. Die Promotor-Analysen wurden mit dem Programm MatInspector V2.2 basierend auf TRANSFAC 4.0 (QUANDT *et al.*, 1995) durchgeführt.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft®-Excel 97 oder dem Programm GraphPad Prism (Version 3.0 for Windows; GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA) und umfaßte mindestens zwei unabhängige Experimente mit 2-6 Replika.

Die im Ergebnisteil dargestellten Standardabweichungen (SD) sind nach folgender Formel berechnet worden:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_{\text{Mittelwert}})^2}{n - 1}}$$

(y_i = Einzel-Messwerte; $y_{\text{Mittelwert}}$ = Mittelwert aller Einzel-Messwerte, n = Anzahl der Replika)

Die angegebenen Signifikanzen wurden, wenn nicht anders vermerkt, in GraphPad Prism mit Bonferroni's Multiple Comparison Test ermittelt. Als Signifikanzkriterium wurde $p < 0.05$ definiert. Die Signifikanzen betragen (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ und (***) $p < 0.001$.

Die planimetrische Auswertung der Areale von DNA-Fragmente, die durch semi-quantitative RT-PCR und anschließende gelelektrophoretische Auftrennung erhalten wurde, erfolgte mit Hilfe des Programms QuantiScan (Biosoft, Cambridge, UK).

Die Dissertation wurde mit Programmen des Mikrosoft Office-Pakets, GraphPad Prism und Adobe Photoshop 5.0 verfaßt.

3 Ergebnisse

3.1 Signaltransduktionsanalysen zur Aktivierung des CCL15-Gens

3.1.1 Etablierung eines pCC-2-Luciferase-Reportergen Tests

Das humane Chemokin CCL15 (früher HCC-2) gehört zu der Unterfamilie der CC-Chemokine (PARDIGOL *et al.*, 1998). CCL15 kann auf eine Vielzahl von Leukozyten chemotaktische Wirkung ausüben, seine Expression galt bisher als limitiert (siehe 1.3.3). Die molekularen Regulationsmechanismen der Genexpression von CCL15 sind bisher nicht detailliert untersucht worden. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung CCL15-aktivierender Signaltransduktionswege. Voraussetzung dafür war ein biologisches Testsystem, das eine Detektion der Aktivierung der CCL15-Genexpression ermöglichte. Es wurde ein Luciferase-Reportergen Test genutzt, bei dem die Expression des Luciferasegens unter die Kontrolle eines potentiellen Promotors gestellt wird. Durch die entstehende Luciferaseaktivität kann auf die Promotoraktivierung und somit auf die Expression des zu untersuchenden Gens geschlossen werden. Für die Etablierung eines *in vitro* Tests wurde ein 1996 von Andreas Pardigol kloniertes pCC-2-Luciferase-Reportergenkonstrukt (pCC-2-luc) verwendet, das einen potentiellen Promotorbereich von 844 bp (-800 bp bis +44 bp) des CCL15-Gens enthält (PARDIGOL Dissertationsschrift 1996). Für die Etablierung des Luciferase-Reportergen Tests wurden Analysen zur endogenen CCL15-Expression in Geweben (3.1.1.1) und Zelllinien (3.1.1.2) durchgeführt sowie pCC-2-luc-aktivierende Substanzen (3.1.1.3) ermittelt. Eine stabile Transfektion von endogen exprimierenden CCL15 Zellen mit pCC-2-luc gewährleistete konstante und reproduzierbare Bedingungen und ermöglichte das Arbeiten im 96-Well-Format (3.1.1.4).

3.1.1.1 Endogene Expression von CCL15 in humanen Geweben

Die Expression von CCL15 wurde in 15 humanen Geweben mittels *TaqMan*-Analyse quantifiziert. Die Menge an CCL15-Transkripten wurde durch den Abgleich mit einem definierten CCL15-Standard ermittelt und anschließend eine relative Quantifizierung im Vergleich zum Haushaltsprotein ("housekeeping-Gen") hGAPDH durchgeführt.

Aus Abbildung 3 geht hervor, daß CCL15 am höchsten in der Leber exprimiert wird (vgl. COULIN *et al.*, 1997, PARDIGOL *et al.*, 1998). Mäßige Expression war in der Luftröhre und Niere detektierbar sowie in geringerem Maß in Kolon und Lunge. Schwache Expression wurde in Harnblase, Jejunum, Antrum, Hoden, Nebennierendrüse, Gehirn und Schilddrüse ermittelt. In Speicheldrüse, Prostata und Herz konnten keine CCL15-Transkripte nachgewiesen werden.

Von der in Abbildung 3 dargestellten Untersuchung der CCL15-Genexpression in humanen Geweben war bisher nur eine Expression von CCL15 in Leber, Darm, Lungenleukozyten (COULIN *et al.*, 1997), sowie in Herz, Skelettmuskel und Nebennierendrüse (YOUN *et al.* 1997) bekannt.

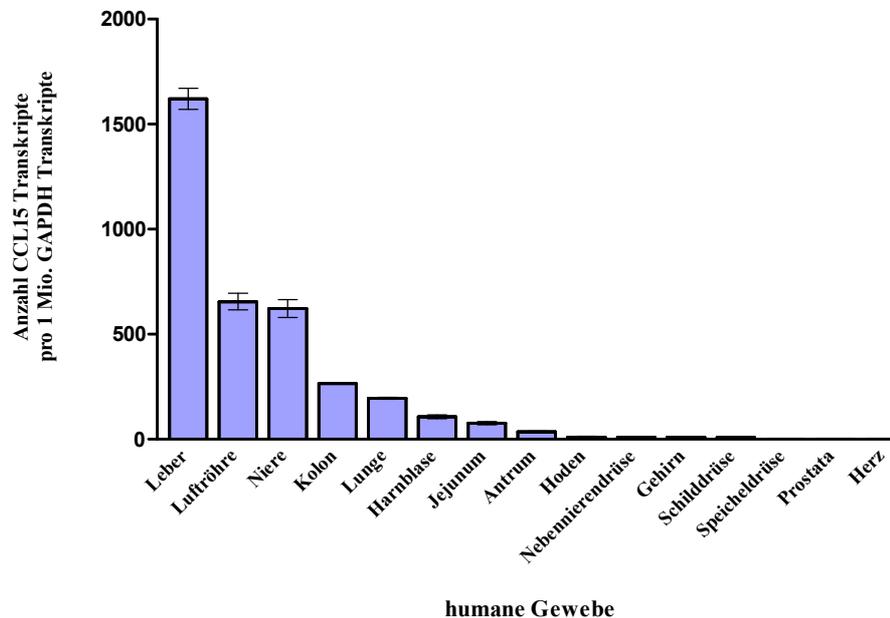


Abbildung 3

Bestimmung der CCL15-Genexpression in humanen Geweben. Mittels TaqMan-Analysen wurde in 15 cDNAs humanen Gewebes die CCL15-Transkriptmenge mit spezifischen Primern untersucht. Zur Quantifizierung der Transkriptmenge wurde mit einem definierten CCL15-Standard abgeglichen sowie eine Normalisierung auf GAPDH durchgeführt.

In dieser Arbeit konnte zusätzlich dazu eine Expression in Niere und Trachea sowie das Vorkommen in Harnblase, Jejunum, Testis, Gehirn und Schilddrüse nachgewiesen werden. Die konstitutive Genexpression von CCL15 ist demnach weniger limitiert als bisher angenommen. Weiterhin ist erkennbar, daß CCL15-Expression primär in Organen detektiert werden konnte, die eine hohe Stoffwechselaktivität und gute Blutversorgung besitzen. Eine Ausnahme stellt hierbei die Luftröhre dar. Im Blut zirkulierende Immunzellen könnten somit schnell und effektiv durch Chemokine rekrutiert werden und in das Gewebe infiltrieren.

3.1.1.2 Endogene Expression von CCL15 in humanen Zelllinien

Das durch TaqMan-Analyse erhaltene Expressionsmuster von CCL15 in humanen Geweben diente als Basis für die Auswahl der zu testenden Zelllinien. Für Gewebe mit hoher Transkriptionsmenge (Leber, Niere, Lunge) wurden entsprechende Zelllinien humanen Ursprungs (HuH-7, HEK 293, NCI-H720, SAEC) ausgewählt. Diese wurde mit weiteren zur Verfügung stehenden humanen Zelllinien (HGF,

HS 1.TES, MHHES-1, WFZ) mittels *TaqMan*-Analyse auf die endogene CCL15-Expression untersucht. Die Auswertung und Quantifizierung wurden wie in Kapitel 2.5 beschrieben durchgeführt.

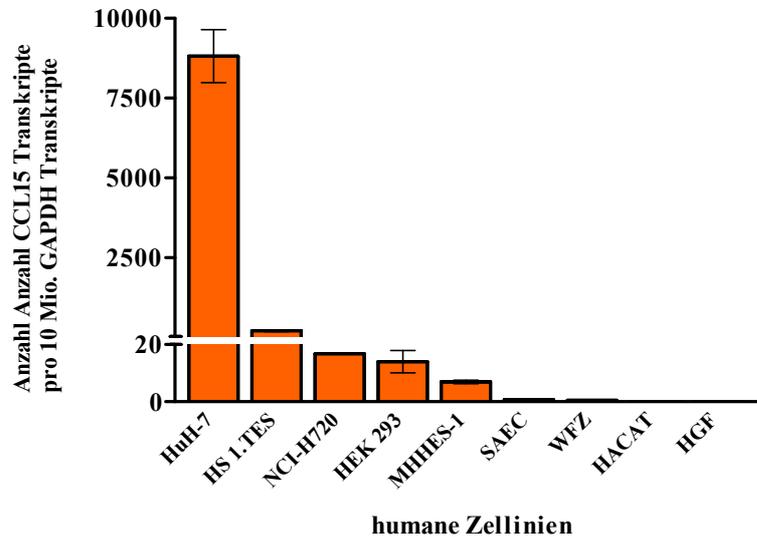


Abbildung 4

Bestimmung der CCL15-Expression in Zelllinien mittels TaqMan-Analyse. Neun cDNAs verschiedener Zelllinien wurden mit spezifischen Primern auf die CCL15-Expression untersucht. Die Bestimmung der Transkriptmenge erfolgte im Abgleich auf einen definierten CCL15-Standard.

Der Vergleich der Transkriptmengen aller getesteten Zelllinien untereinander zeigt, daß die humane Hepatoma Zelllinie HuH-7 die höchste Anzahl an Transkripten aufweist. Dieses Ergebnis einer hohen detektierten CCL15-Genexpression in der Leber (3.1.1.1) sowie in einer humanen Leberzelllinie deutet auf eine funktionelle Relevanz von CCL15 in der Leber hin. Die untersuchten Zelllinien renalen und pulmonalen Ursprungs zeigen nur geringe Expression von CCL15. Die weiteren Untersuchungen wurden daher mit HuH-7 Zellen durchgeführt.

3.1.1.3 Identifizierung pCC-2-luc-aktivierender Substanzen

Die CCL15-exprimierende Zelllinie HuH-7 wurde anschließend zur Detektion pCC-2-luc-aktivierender Substanzen verwendet. Die Identifizierung von pCC-2-luc-aktivierenden Agentien ermöglicht die Charakterisierung der an der Signaltransduktion beteiligten Regulationsmechanismen und diente somit der Aufklärung der Regulation von CCL15. Für Chemokine ist bekannt, daß ihre Produktion durch den zellulären Kontext und den Einfluß von verschiedenen Zytokinen reguliert wird (MANTOVANI & SOZZANI 2000). Es wurden zwölf Zytokine in physiologischen Konzentrationen im Luciferase-Reporter-Test auf ihre pCC-2-luc-Aktivierung getestet (Abb.5). Die Lichtemission ist ein Maß für die Promotoraktivität und wird in "Relative Light Unit" (RLU) angegeben.

Abbildung 5 zeigt, daß im Reporter-gen Test vier Zytokine detektiert werden konnten, die zu einer signifikanten Aktivierung von pCC-2-luc führen. Es handelt sich um die Interleukine IL-1 β und IL-6 sowie um die Interferone INF- α und INF- γ . Hierbei sind die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 sowohl in akuten wie auch chronischen Entzündungen der Leber beteiligt (ARAI *et al.*, 1990). Die Stimulation einer humanen Leberzelllinie mit IL-1 β und IL-6 konnte das Promotorkonstrukt pCC-2-luc aktivieren, so daß eine Beteiligung von CCL15 in Entzündungsprozessen der Leber zu vermuten ist. In weiteren Versuchen wurden deshalb die Signaltransduktionswege der IL-1 β - und IL-6-vermittelten pCC-2-luc-Aktivierung in HuH-7 Zellen analysiert.

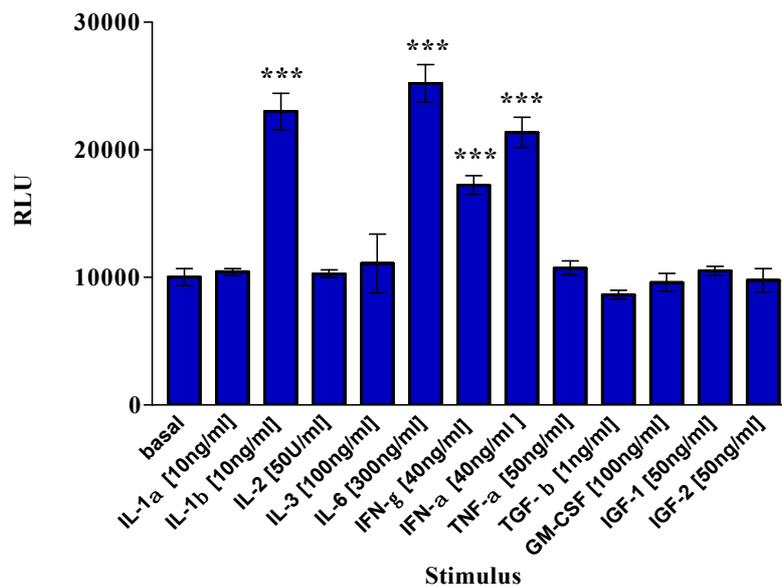


Abbildung 5

Aktivierung des pCC-2-luc-Promotorkonstrukts nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen. HuH-7 Zellen wurden mit pCC-2-luc transient transfiziert und mit den Zytokinen in angegebener Konzentration für 6 h inkubiert. Die resultierende Luciferaseaktivität wird als "Relative Light Unit" (RLU) angegeben, Signifikanzen beziehen sich auf die Basalaktivität unstimulierter Zellen (basal).

3.1.1.4 Stabile Transfektion von HuH-7 Zellen mit pCC-2-luc

Damit bei der Charakterisierung der Signaltransduktionswege von IL-1 β und IL-6 eine hohe Effizienz, eine hohe Validität und Reproduzierbarkeit gewährleistet werden konnte, wurden HuH-7 Zellen stabil mit pCC-2-luc transfiziert (siehe 2.3.1.2.1). Die selektierten Klone wurden auf die stabile Integration des Reporterkonstrukts in das Genom kontrolliert. Hierzu wurden die Zellen auf 96-Well-Platten ausgesät und am Folgetag ihre Basalaktivität im Luciferase-Reporter-gen Test ermittelt.

Abbildung 6 zeigt, daß EK 2 eine höhere intrinsische Luciferase-Basalaktivität aufwies als die übrigen Einzelklone. EK 2, fortlaufend als Angela bezeichnet, wurde daher auf stabile Integration getestet, indem die Zellen einem Einfrier/Auftau-Zyklus unterzogen wurden und die drei nächsten Passagen auf die konzentrationsabhängige Aktivierung von pCC-2-luc durch IL-1 β und IL-6 getestet wurden.

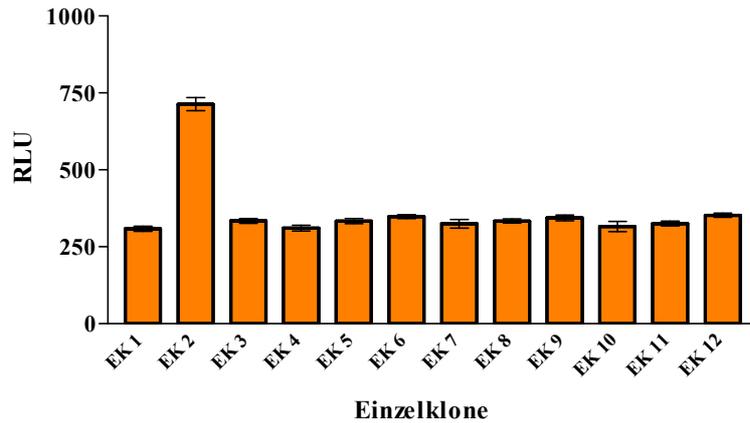


Abbildung 6

Bestimmung der Basalaktivität der Einzelklone nach stabiler Transfektion mit pCC-2-luc. HuH-7 Zellen wurden stabil mit pCC-2-luc transfiziert, Einzelklone selektiert und auf den Einbau des pCC-2-luc-Konstrukts getestet.

3.1.1.5 Stabile Integration des Reporterkonstrukts pCC-2-luc

Der Test auf stabile Integration des Reporterkonstrukts pCC-2-luc in das Genom von Angela (EK 2) erfolgte durch konzentrationsabhängige Stimulation mit IL-6 [3×10^{-7} bis 1×10^{-9}] bzw. IL-1 β [3×10^{-8} bis 1×10^{-11}].

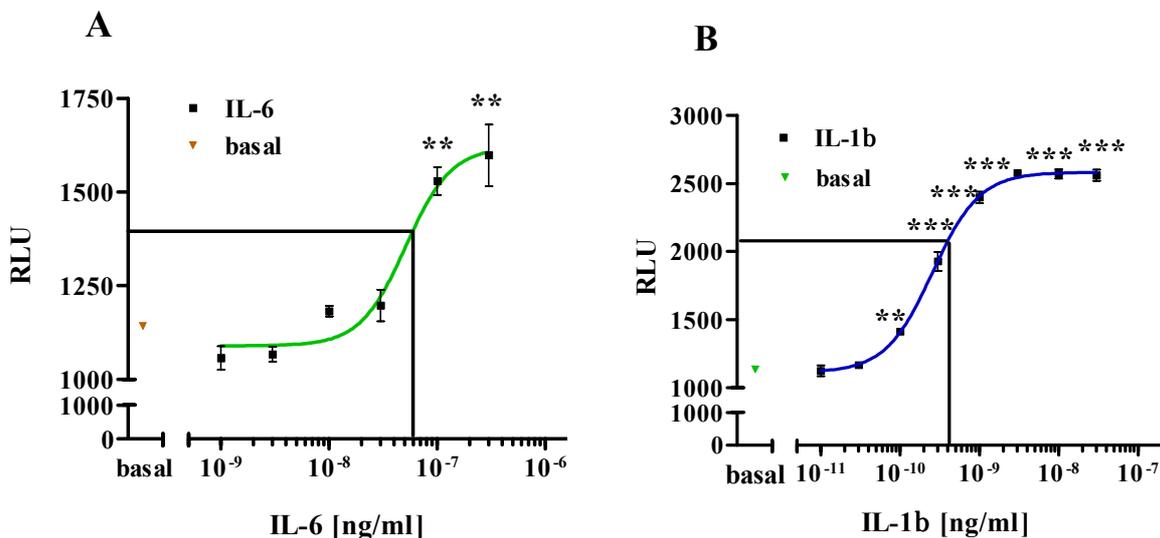


Abbildung 7

Nachweis der Induktion von pCC-2-luc nach Stimulation mit IL-6 (A) und IL-1 β (B) im Luciferase-Reportergen Test. Angela wurde 6 h mit dem jeweiligen Interleukin in ansteigender Konzentration stimuliert. Der Basalwert entsprach der Aktivität unstimulierter Zellen von Angela; die EC_{50} -Werte sind graphisch dargestellt. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den Basalwert (basal).

Zellen von Angela wurden hierfür auf einer 96-Well-Kulturplatte ausgesät und mit den Interleukinen inkubiert, als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Für beide Interleukine zeigt sich eine konzentrationsabhängige Aktivierung des Promotorkonstrukts pCC-2-luc, wobei der EC₅₀-Wert von IL-6 bei 5×10^{-8} ng/ml (Abb. 7A) und von IL-1 β bei 3×10^{-10} ng/ml (Abb. 7B) liegt.

3.1.2 Charakterisierung der Signaltransduktionswege bei IL-1 β - und IL-6-vermittelter pCC-2-luc Aktivierung

Die bisher erhaltenen Daten lassen auf eine mögliche Beteiligung von CCL15 in akuten oder chronischen Entzündungsprozessen der Leber schließen, induzierbar durch die Interleukine IL-1 β und IL-6. Eine genauere Analyse der Signaltransduktionsmechanismen, die an der pCC-2-luc-Aktivierung beteiligt sind, ist somit von Interesse und wurde mittels Reportergeräten Tests charakterisiert (siehe 2.3.1.4). In der Regel wurden die stabil transfizierten HuH-7 Zellen Angela genutzt; transiente Transfektionsexperimente sind als solche vermerkt.

3.1.2.1 Hemmung der Interleukin-vermittelten pCC-2-luc-Aktivierung durch Rezeptor-Antikörper

Der erste Schritt in der Signalvermittlung besteht in der Bindung der Signalmoleküle an den entsprechenden Rezeptor. Zytokin-Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Zytokin-bindenden und einer cytoplasmatischen Domäne (siehe 1.2.2). Letztere ist an der Initiation der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligt, weist selbst keine endogene Protein Tyrosinkinase-Aktivität (PTK) auf, so daß die Tyrosinkinase-Aktivität durch intrazelluläre Tyrosinkinasen vermittelt wird (ARAI *et al.*, 1990, DINARELLO 1996, AURON 1998, HIRANO 1998). Der IL-6-Rezeptor besteht aus der IL-6-bindenden Polypeptidkette gp80 und einem Signalumwandler gp130 (TAGA *et al.*, 1989, HIBI *et al.*, 1990). Der IL-1-Rezeptorkomplex besteht aus IL-1R, der IL-1 bindet und dem "IL-1 Receptor accessory protein" (IL-RAcP), das für die Signalweiterleitung von IL-1 verantwortlich ist (GREENFEDER *et al.*, 1995, KORHERR *et al.*, 1997, WESCHE *et al.*, 1997).

Die spezifische Bindung der Interleukine an ihre Rezeptoren wurde im Reportergeräten Test unter der Verwendung der Rezeptor-Antikörper rhIL-6 sR sowie rhIL-1 sRI untersucht. Die Wirkung von rhIL-6 sR und rhIL-1 sRI besteht in der Blockade der Interleukin-vermittelten Bioaktivität. HuH-7 Zellen wurden vor Interleukin-Stimulation für 20 min mit den Rezeptor-Antikörpern vorinkubiert. Um Kreuzreaktionen auszuschließen, wurde nach Vorinkubation mit rhIL-6 sR bzw. rhIL-1 sRI eine Stimulation mit jeweils beiden Interleukinen vorgenommen. Die gemessene Luciferaseaktivität (RLU) wurde normalisiert und als relative Aktivität in Prozent angegeben. Hierbei entsprach der Basalwert unstimulierter Zellen 0%, der Maximalwert nach Interleukin-Stimulation wurde als 100% definiert.

Abbildung 8 stellt die konzentrationsabhängige Hemmung von rhIL-6 sR (Abb. 8A) und rhIL-1 sRI (Abb. 8B) auf die jeweilige Interleukin-vermittelte pCC-2-luc-Aktivierung dar. Die Promotor-konstrukt-Aktivierung resultiert aus einer spezifischen Bindung und somit Aktivierung von IL-1 β bzw. IL-6 an ihre Rezeptoren. Für rhIL-6 sR mit IL-1 β (Abb. 8A: β , χ , δ , ϵ) sowie für rhIL-1 sRI mit IL-6 (Abb. 8B: c) ist eine geringe Reduktion der Luciferaseaktivität zu verzeichnen, die jedoch im Verhältnis zu der Wirkung auf das korrespondierende Interleukin (Abb. 8A: b-e, Abb. 8B: δ - ϵ) als vernachlässigbar anzusehen ist.

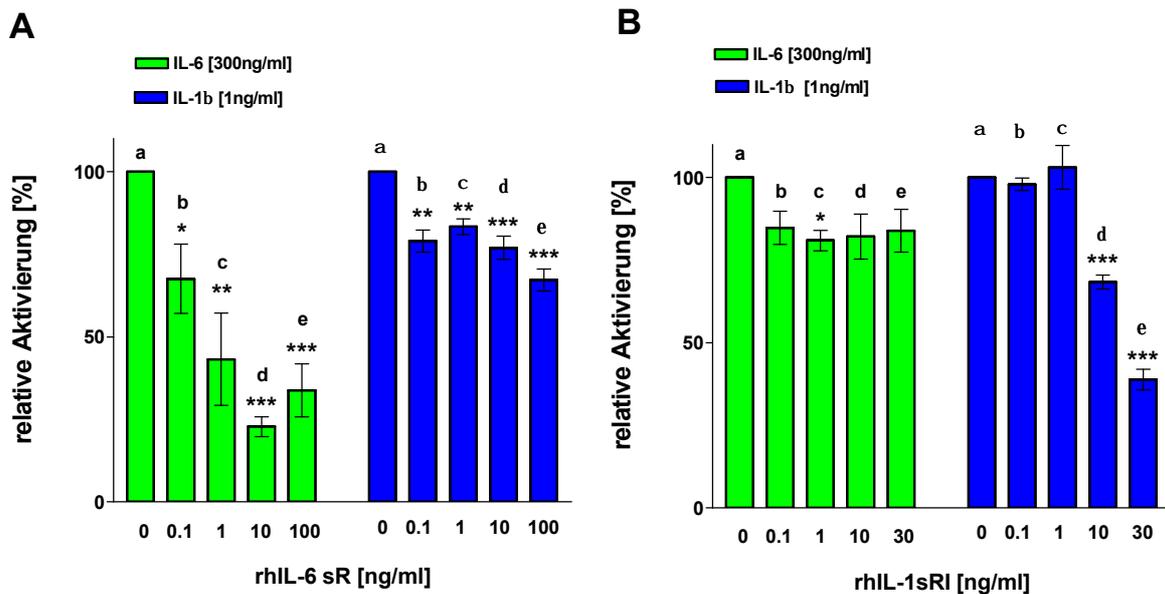


Abbildung 8

Effekt der Rezeptor-Antikörper auf die von Interleukinen vermittelte pCC-2-luc-Aktivierung. Stabil transfizierte HuH-7 Zellen wurden für 20 min mit den Antikörpern rhIL-6 sR (A) bzw. rhIL-1 sRI (B) in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit jeweils IL-6 [100 ng/ml] und IL-1 β [1 ng/ml]. Dargestellt ist die relative Aktivierung des pCC-2-luc-Promotorkonstrukts in Prozent. Die angegebenen Signifikanzen (b, c, d, e, b, c, d, e) sind jeweils bezogen auf die Stimulation von IL-6 (a) bzw. IL-1 β (a).

3.1.2.2 Hemmung der Interleukin-vermittelten pCC-2-luc-Aktivierung durch pharmakologisch wirksame Substanzen

Rezeptoren werden durch Bindung von Signalmolekülen aktiviert und geben das Signal an nachgeschaltete Effektoren des Signalwegs weiter. Diese können ihrerseits ein oder mehrere intrazelluläre Proteine aktivieren. Bei den beteiligten Signalproteinen kann es sich um Adaptermoleküle oder Enzyme handeln. Die Aktivierung von Enzymen wiederum kann zur Bildung von intrazellulären Botenstoffen ("second messenger") führen, die ihrerseits das Signal durch Enzymaktivierung weiterleiten (HUNTER 2000). Die Weiterleitung der Signale kann über G-Proteine

(GILMAN 1987), Tyrosin-spezifische Proteinkinasen (HUNTER & COOPER, 1985) und Aktivierung von Ionenkanälen (BERRIDGE & IRVINE, 1989) erfolgen.

Zur exakten Aufklärung eines intrazellulären Signalwegs und den daran beteiligten Effektoren können pharmakologische Inhibitoren verwendet werden. Diese Substanzen, in der Regel Kinase-Inhibitoren, können auf verschiedene Weise, kompetitiv oder nichtkompetitiv, bestimmte Proteinkinasen hemmen. Die Signalweiterleitung ist an dieser Stelle unterbrochen und resultiert im Reporter-gen Test in einer reduzierten Luciferaseaktivität.

Stabil transfizierte HuH-7 Zellen wurden 20 min mit den Inhibitoren vorinkubiert und anschließend für weitere 6 h mit IL-1 β oder IL-6 stimuliert. Die resultierende Luciferaseaktivität wurde normalisiert, wobei 0% der Basalaktivität unstimulierter Zellen und 100% der Stimulation mit IL-6 (Abb. 10A) bzw. IL-1 β (Abb. 10B) entspricht. In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Inhibitoren mit ihrer Wirkungsweise aufgeführt.

Verwendete Inhibitoren und ihre Wirkungsweise

Inhibitor	Wirkungsweise	Literatur
BAY 11-7085	hemmt I κ B- α -Phosphorylierung	PIERCE <i>et al.</i> , 1997
Bisindolylmaleimid	hemmt Proteinkinase C	TOULLEC <i>et al.</i> , 1991
Chelerythrin	hemmt Translokation der Proteinkinase C vom Cytosol zur Plasmamembran	HERBERT <i>et al.</i> , 1990
Ionomycin	Ca ²⁺ -Ionophor	TOEPLITZ <i>et al.</i> , 1979
KN-62	hemmt Calmodulin abhängige Proteinkinase II	COMMUNI <i>et al.</i> , 1999
Ly 294002	hemmt Phosphatidylinositol-3 Kinase	VLAHOS <i>et al.</i> , 1994
Neomycin	blockiert spannungsabhängige Ca ²⁺ -Kanäle	HUANG <i>et al.</i> , 1999
PD 98059	hemmt pMAPK42/44	ALESSI <i>et al.</i> , 1995
Rottlerin	hemmt Proteinkinase C- γ	GSCHWENDT <i>et al.</i> , 1993
Rp-8-CPT-cAMPS	hemmt Proteinkinase A Typ II	GJERTSEN <i>et al.</i> , 1995
SB 203580	hemmt pMAPK 38 und MAPKAP Kinase-2	BÖRSCH-HAUBOLD <i>et al.</i> , 1998
NF- κ B SN 50	hemmt Translokation des aktiven NF- κ B-Komplexes in den Kern	LIN <i>et al.</i> , 1995
Thapsigargin	aktiviert IP ₃ -unabhängig Ca ²⁺ -Freisetzung aus dem ER	TREIMANN <i>et al.</i> , 1998
Tyrphostin AG 490	hemmt Tyrosinkinase JAK-2	AL-SHAMI <i>et al.</i> , 1999
Wortmannin	hemmt Phosphatidylinositol-3 Kinase	POWIS <i>et al.</i> , 1994

Zudem wurden ergänzend Untersuchungen mittels Western-Immunoblot Analyse durchgeführt. Dieses Verfahren ermöglicht den Nachweis intrazellulärer Proteine wie Transkriptionsfaktoren und Protein-

kinasen. Es wurden hierfür HuH-7 Wildtyp Zellen mit IL-1 β sowie IL-6 für 30 min und 6 h inkubiert und anschließend lysiert (siehe 2.3.1.3), als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Der Western-Immunoblot wurde wie unter Material und Methoden (2.4.1) beschrieben durchgeführt, unter Verwendung eines phosphospezifischen Antikörpers für pMAPK (Cell Signaling).

Wie Abbildung 10A zeigt, hemmt der Janus-Kinase 2 (JAK2)-Inhibitor Tyrphostin AG 490 die IL-6-vermittelte pCC-2-luc-Aktivierung signifikant. Das Ergebnis weist auf eine Beteiligung von JAK2 an der Signalweiterleitung von IL-6 hin. JAK2 gehört zur Familie der Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen, deren Tyrosin-Phosphorylierung unmittelbar zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors "Signal Transducer and Activator of Transcription" (STAT) führt, wodurch eine schnelle und direkte Signalübertragung von der Membran zum Zellkern ermöglicht wird (DARNELL 1994). GERHARTZ *et al.* (1996) und HEINRICH *et al.* (1998) beschrieben, daß der JAK/STAT-Weg einer der Hauptsignalwege von IL-6 ist. Ein weiterer Schlüsselmechanismus in der IL-6-Signalweiterleitung ist der Ras-vermittelte "mitogen activated protein kinase" (MAPK)-Weg. Der Ras/MAPK-Signalweg kann über das "src homology domain (SH2)-containing protein tyrosin phosphatase" (SHP2) (FUKADA *et al.*, 1996) oder Shc (KUMAR *et al.*, 1994) aktiviert werden. Eine Beteiligung der MAPK konnte im Reporteragen Test unter Verwendung des Inhibitors PD 98059 nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Wie aus Abbildung 9 ersichtlich, konnte jedoch durch die sensitivere Methode des Western-Immunoblots eine deutliche Induktion der MAPK (pMAPK) sowohl nach 30 min als auch nach 6 h gezeigt werden. Die IL-6-vermittelte CCL15-Aktivierung scheint demnach über eine Beteiligung des Ras/MAPK-Signalwegs gesteuert zu werden.

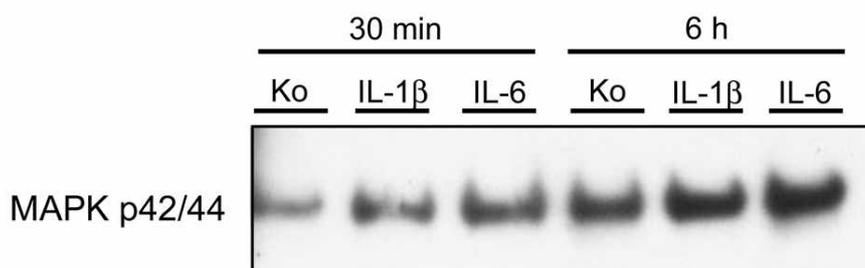


Abbildung 9

Western-Immunoblot Analyse mit einem phosphospezifischen Antikörper für MAPK. Zellen der humanen Hepatoma Zelllinie HuH-7 wurden für 30 min und 6 h mit den oben angezeigten Agentien stimuliert, die Kontrolle (Ko) entsprach unstimulierten Zellen. Die Induktion der MAPK (pMAPK) wurde durch den phosphospezifischen Antikörper Phospho-p44/42 MAP Kinase nachgewiesen.

Im Reporteragen Test konnten weder eine Beteiligung der Streß-aktivierten Kinase MAPK p38 (p38), noch eine Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) oder des Transkriptionsfaktors "Nuclear Factor- κ B" (NF κ B) durch die entsprechenden Inhibitoren (vgl. Tabelle 3.1.2.2) nachgewiesen werden (Abb. 10A).

Die Daten (Abb. 10A) zeigen jedoch, daß es durch Hemmung der PKA mit Rp-8-CPT-cAMPS zu einer signifikant verringerten Aktivierung des pCC-2-luc-Promotorkonstrukts kommt. Diese Untersuchungen weisen erstmals auf eine Beteiligung der PKA an der IL-6-vermittelten CCL15-Genexpression hin. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Rolle der PKA an der IL-6-vermittelten Signalweiterleitung im folgenden näher analysiert.

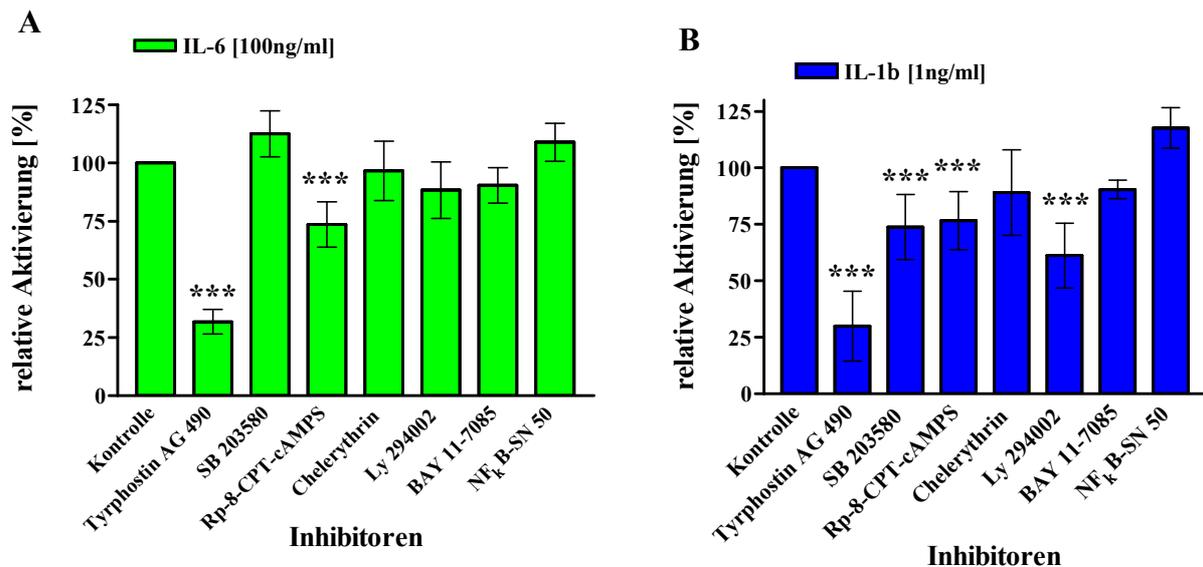


Abbildung 10

Wirkung pharmakologischer Inhibitoren auf die Interleukin-vermittelte pCC-2-Promotorkonstrukt-Induktion. Stabil transfizierte HuH-7 Zellen wurden 20 min mit den Inhibitoren inkubiert (Tyrphostin AG 490 [10 μ M], SB 203580 [3 μ M], Rp-8-CPT-cAMPS [100 μ M], Chelerythrin [1 μ M], Ly 294002 [10 μ M], BAY 11-7085 [10 μ M], NF κ B SN 50 [10 μ M]) und für weitere 6 h mit den Interleukinen IL-6 [100 ng/ml] (A) bzw. IL-1b [1 ng/ml] (B) stimuliert. Die Signifikanzen beziehen sich auf den jeweiligen 100%-Wert (Kontrolle) und wurden mittels t-Test mit Welchs Korrektur ermittelt.

Abbildung 10B zeigt die signifikante Hemmung der IL-1 β -vermittelten pCC-2-luc-Aktivierung durch Tyrphostin AG 490 und läßt auf eine Beteiligung der JAK2 in der IL-1 β -Signalweiterleitung schließen. Eine solche Beteiligung konnte bisher nicht nachgewiesen werden, ist jedoch diskutiert worden (TSUKADA *et al.*, 1996).

Eine Inkubation mit SB 203580 resultierte in einer signifikanten Abnahme der pCC-2-luc-Aktivität (Abb. 10B). Die Beteiligung von p38 im IL-1-Signalweg wurde von O'NEILL & GREENE (1998) beschrieben und scheint für die IL-1 β -vermittelte CCL15-Expression in dem genutzten Leberzellsystem relevant zu sein. Als weitere Proteinkinase der MAPK-Familie konnte im Western-Immunoblot die phosphorylierte Form der MAPK (pMAPK) zu den Zeitpunkten 30 min und 6 h nachgewiesen werden (Abbildung 9). Der Ras/MAPK-Signalweg scheint durch IL-1 β induziert zu werden, und ist somit vermutlich an der IL-1 β -vermittelten Promotorinduktion von CCL15 beteiligt.

Wie aus Abbildung 10B weiterhin hervorgeht, führt die Inkubation mit Rp-8-CPT-cAMPS zu einer signifikanten Hemmung der IL-1 β -vermittelten Promotorkonstrukt-Aktivität. Die Beteiligung der PKA im Signalweg von IL-1 wurde bereits beschrieben (CHEDID & MIZEL 1990, O'NEILL *et al.*, 1990). Für Zellen verschiedenen Ursprungs wurde von SHIRAKAWA *et al.* (1988) und CHEDID *et al.* (1989) gezeigt, daß die Gabe von IL-1 zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt. CHEDID & MIZEL (1990) und O'NEILL *et al.* (1990) konnten nachweisen, daß der IL-1-Rezeptor an ein G-Protein gekoppelt ist, das seinerseits die Adenylat-Zyklase aktiviert und so zur Phosphorylierung der PKA führt. Die detektierte hemmende Wirkung von Rp-8-CPT-cAMPS (Abb. 10B) deutet auf eine Beteiligung der PKA in der IL-1 β -induzierten Genexpression von CCL15 hin.

Die Inkubation mit Ly 294002 führt ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der pCC-2-luc-Promotorkonstrukt-Aktivität (Abb. 10B). FRY zeigte bereits 1994 die Interaktion zwischen der SH2-Domäne der regulatorischen Untereinheit der PI3K mit dem YXXM-Motiv von Zytokin-Rezeptoren. PI3K kann durch unterschiedlichste Liganden aktiviert werden und ist in einer Reihe verschiedener Signalwege involviert und kann verschiedene Signalmoleküle aktivieren (siehe 1.1.4). Die aus dem Experiment hervorgehenden Daten (Abb.10B) deuten auf eine Beteiligung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) an der Interleukin-1 β -vermittelten CCL15-Expression in Leberzellen hin.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor in der Interleukin-1 β -vermittelten Signalweiterleitung ist NF κ B, ein Hauptregulator in Entzündungs- und Immunreaktionen (BAEUERLE, 1998). In dem hier genutzten Zellsystem konnte eine Beteiligung von NF κ B an der pCC-2-luc-Aktivierung durch Behandlung mit den Inhibitoren NF- κ B SN 50 und BAY 11-7085 nicht nachgewiesen werden. Ein Mitwirken der PKC konnte weder durch die Gabe von Chelerythrin (Abb. 10B) noch durch Bisindolyl oder Rottlerin (nicht dargestellt) ermittelt werden.

Zusammengefaßt läßt sich feststellen, daß IL-1 β und IL-6 die pCC-2-luc-Aktivierung über konvergente Signalwege (PKA, JAK2, MAPK) induzieren können; für die IL-1 β -Signalweiterleitung konnten weitere Mediatoren (PI3K, p38) ermittelt werden. In der Interleukin-1 β - sowie der Interleukin-6-vermittelten Promotorkonstrukt-Aktivierung wurden bisher nicht bekannte Mediatoren detektiert (PKA für IL-6, JAK2 für IL-1 β). Eine Kalizumabhängigkeit konnte durch die verwendeten Inhibitoren (Ionomycin, KN-62, Thapsigargin, Neomycin) weder für IL-1 β noch für IL-6 gezeigt werden.

Alle wirksamen Inhibitoren wurden zudem in physiologisch relevanten Konzentrationen auf ihre Dosisabhängigkeit getestet. Exemplarisch hierfür ist in Abbildung 11 die konzentrationsabhängige Wirkung des JAK2 Inhibitors Tyrphostin AG 490 auf die IL-1 β -vermittelte pCC-2-luc-Aktivierung dargestellt. Der EC₅₀-Wert für Tyrphostin AG 490 liegt bei $1,6 \times 10^{-5}$ M. Alle ermittelten EC₅₀-Werte liegen in dem Bereich von 6×10^{-5} M und 8×10^{-6} M (IL-6: Tyrphostin AG 490 5×10^{-5} M, Rp-8-CPT-cAMPS 6×10^{-5} M, IL- β : SB 203580 $1,2 \times 10^{-5}$ M, Rp-8-CPT-cAMPS 8×10^{-6} M).

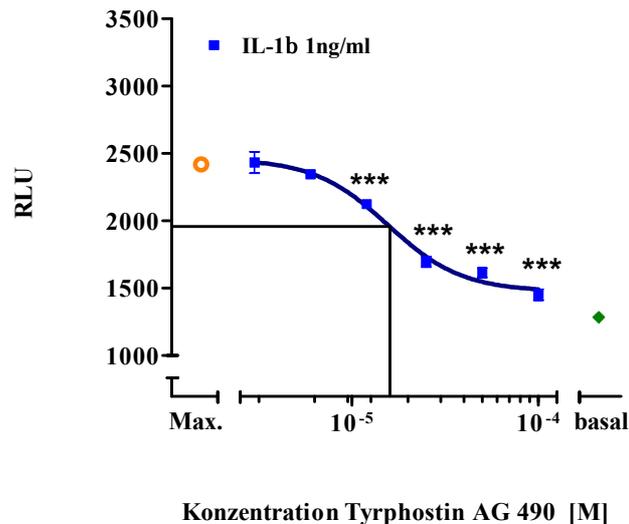


Abbildung 11

Konzentrationsabhängige Wirkung des JAK2-Inhibitors Tyrphostin AG 490 auf die Interleukin-1 β -vermittelte pCC-2-Promotorkonstrukt-Aktivierung. Stabil transfizierte HuH-7 Zellen wurden 20 min mit Tyrphostin AG 490 in physiologischen Konzentrationen inkubiert und für weitere 6h mit IL-1 β [1 ng/ml] stimuliert. Der Basalwert (basal) entspricht unstimulierten Zellen und der Maximalwert (Max.) stimulierten Zellen ohne Zugabe von Tyrphostin AG 490; der EC_{50} -Wert ist graphisch dargestellt.

3.1.2.3 Charakterisierung der PKA-vermittelten pCC-2-luc-Aktivierung

Die Untersuchungen mit Rp-8-CPT-cAMPS gaben erstmals Hinweise auf eine Beteiligung der PKA an der IL-1 β - und IL-6-vermittelten Signalweiterleitung. Es ist bekannt, daß Ligandenbindung an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor zur Aktivierung der Adenylat-Zyklase führen kann, resultierend in der Aktivierung der PKA (siehe 1.1.2.1). CHEDID *et al.* (1989) beschrieben eine Aktivierung der Adenylat-Zyklase über ein G-gekoppeltes Protein durch IL-1. Für IL-6 hingegen ist eine G-Protein/Adenylat-Zyklase-vermittelte Signalweiterleitung bisher unbekannt. Die erhaltenen Daten der PKA-vermittelten pCC-2-luc-Aktivierung durch IL-1 β und IL-6 wurden in weiteren Experimenten verifiziert.

3.1.2.3.1 Aktivierung von pCC-2-luc durch PKA-aktivierende Substanzen

Zur Validierung der bisherigen Daten wurden HuH-7 Zellen mit dem PKA-spezifischen und zellpermeablen cAMP-Analog Sp-5,6-DCI-cBiMPS (SANDBERG *et al.*, 1991, SCHWEDE *et al.*, 2000) sowie mit Forskolin, einem Adenylat-Zyklase-Aktivator (SOUZA *et al.*, 1983) in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Bei einer Beteiligung der PKA als Signalmolekül in der pCC-2-luc-Aktivierung wäre eine Promotorkonstrukt-Aktivierung zu erwarten.

Abbildung 12 zeigt, daß die Inkubation mit *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS in dem genutzten Leberzellensystem zu einer konzentrationsabhängigen pCC-2-luc-Promotorkonstrukt-Aktivierung führt. Die niedrigste Konzentration, bei der ein signifikant stimulatorischer Effekt detektiert werden konnte, liegt bei 7×10^{-6} M. Eine Sättigung des Signals in physiologischen Konzentrationen konnte nicht erreicht werden. Bei Stimulation mit Forskolin [0,5 μ M bis 5 μ M] konnte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Aktivierung des pCC-2-luc-Konstrukts in HuH-7 Zellen festgestellt werden (nicht dargestellt). Die Befunde bestätigten die PKA-medierte Aktivierung des Promotorkonstrukts pCC-2-luc.

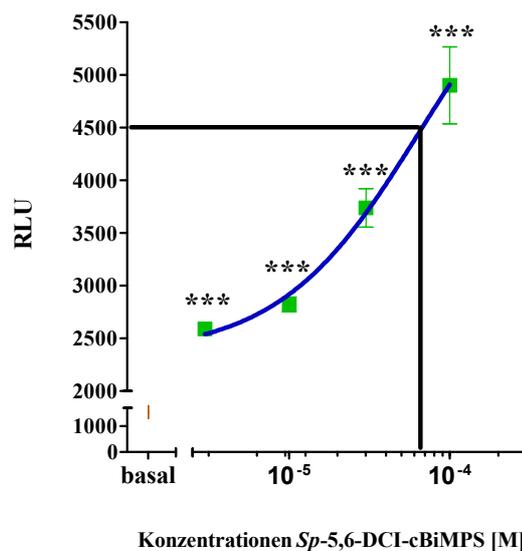


Abbildung 12

Aktivierung des pCC-2-luc-Promotorkonstrukts durch das cAMP-Analog Sp-5,6-DCI-cBiMPS. Stabil transfizierte HuH-7 Zellen wurden für 6 h mit Sp-5,6-DCI-cBiMPS in steigenden Konzentration stimuliert. Der Basalwert entspricht unstimulierten Zellen, der EC_{50} -Wert lag bei $6,5 \times 10^{-5}$ M. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den Basalwert (basal).

3.1.2.3.2 Aktivierung von pCC-2-luc durch Kostimulation von PKA-aktivierenden Substanzen und Interleukinen

Die Beteiligung der PKA an der IL1- β - und IL-6-vermittelten pCC-2-luc-Aktivierung wurde in einem weiteren Versuch vergleichend analysiert. Hierfür wurde eine Kostimulation von HuH-7 Zellen durchgeführt, bei der konstante Mengen *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS in Kombination mit ansteigenden Konzentrationen IL-6 (Abb. 13) sowie IL-1 β (Abb. 14) eingesetzt wurden. Die Interaktion beider Interleukine wurde durch parallele Inkubation von IL-6 [300 ng/ml] mit ansteigenden Konzentrationen IL-1 β [3×10^{-12} M bis 3×10^{-7} M] getestet (Abb. 14, blaue Kurve).

Die konzentrationsabhängige Zunahme der Luciferaseaktivität (RLU) nach Stimulation mit IL-6 (Abb. 13) und IL-1 β (Abb. 14) in ansteigenden Konzentrationen sowie in Kombination mit konstanten Mengen *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS spiegelt sich in den Kurven in Abbildung 13 und 14 wider. Der EC_{50} -Wert liegt bei Stimulation mit IL-6 bei 3×10^{-7} ng/ml und zeigt bei zusätzlicher Gabe von

Sp-5,6-DCI-cBiMPS keine Veränderung (3×10^{-7} ng/ml). Diese Ergebnisse lassen auf eine additive Wirkung von IL-6 und *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS schließen.

Abbildung 14 zeigt, daß die Kostimulation von IL-6 und IL-1 β ebenfalls in einer additiven Aktivierung des pCC-2-luc-Promotorkonstrukts mit einem EC₅₀-Wert von 3×10^{-10} ng/ml resultiert. Kostimulation von IL-1 β und *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS führen zu einer mehr als additiven Erhöhung der Reporter-Responsivität. Diese synergistische Aktivierung spiegelt sich auch in den EC₅₀-Werten wider, die nach IL-1 β -Stimulation bei 3×10^{-10} ng/ml und nach Kostimulation mit *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS bei 4×10^{-10} ng/ml lagen. Bei zeitgleicher Inkubation von IL-1 β [1 ng/ml] und Forskolin [5 μ M] konnte ebenfalls eine mehr als additive Aktivierung detektiert werden (nicht dargestellt).

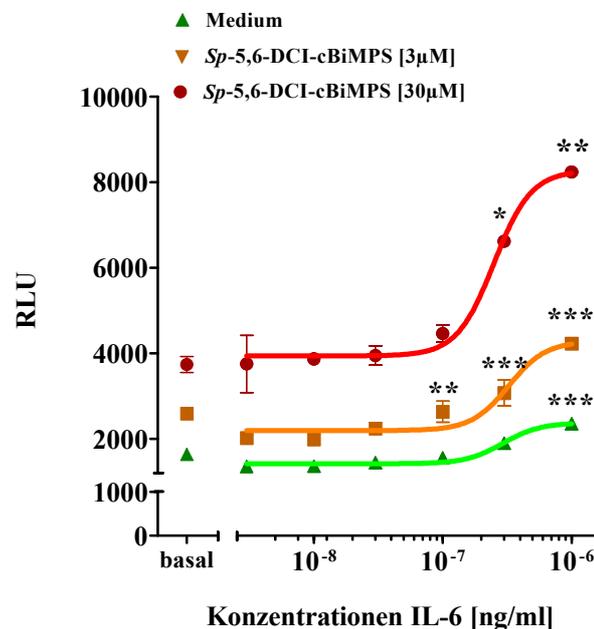


Abbildung 13

Aktivität des pCC-2-luc-Promotorkonstrukts nach Kostimulation von Interleukinen und Sp-5,6-DCI-cBiMPS. Stabil transfizierte HuH-7 Zellen wurden mit IL-6 (grüne Kurve) allein in ansteigenden Konzentrationen sowie mit konstanten Mengen Sp-5,6-DCI-cBiMPS [3 μ M, 10 μ M] stimuliert. Die Basalwerte entsprachen einer Stimulation mit Sp-5,-DC-cBiMPS [3 μ M, 10 μ M] und mit Medium allein. Die Signifikanzen beziehen sich auf den jeweiligen Kontrollwert (basal), der EC₅₀-Wert lag für IL-6 sowie in Kostimulation mit Sp-5,6-DCI-cBiMPS [3 μ M, 10 μ M] bei 3×10^{-7} ng/ml.

Die additive Wirkung von IL-6 und *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS ist Hinweis darauf, daß die Promotorinduktion über den gleichen Signalweg induziert wird. Die mehr als additive Promotoraktivierung von IL-1 β und *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS führt zu der Annahme, daß beide Substanzen über zwei unterschiedliche Signalwege die CCL15-Transkription induzieren, die synergistisch zusammenwirken.

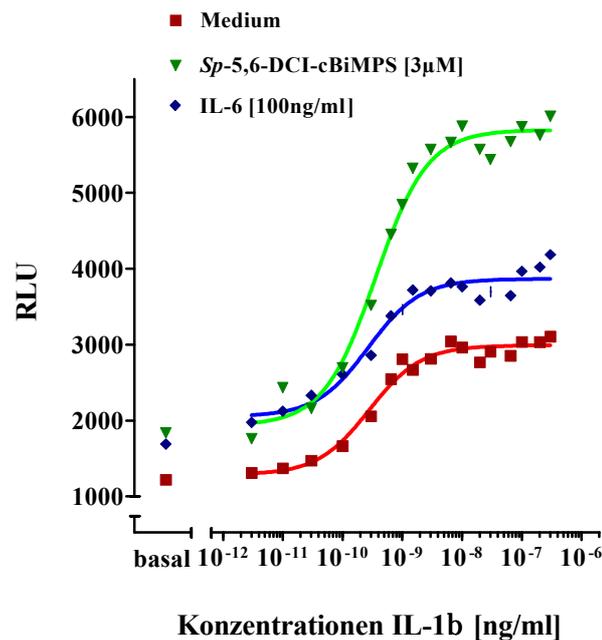


Abbildung 14

Aktivität des pCC-2-luc-Promotorkonstrukts nach Kostimulation von Interleukinen und Sp-5,6-DCI-cBiMPS. Es wurden stabil transfizierte HuH-7 Zellen mit IL-1 β in ansteigenden Konzentrationen (rote Kurve) stimuliert und eine Kostimulation mit konstanten Mengen Sp-5,6-DCI-cBiMPS [3 μ M] (blaue Kurve) und IL-6 (grüne Kurve) durchgeführt. Stimulationen mit Sp-5,-DC-cBiMPS [3 μ M], IL-6 [100 ng/ml] und Medium allein sind als Basalwerte dargestellt. Die Signifikanzen beziehen sich auf den jeweiligen Kontrollwert (basal). Der ermittelte EC₅₀-Wert für IL-1 β alleine sowie in Kostimulation mit IL-6 betrug 3×10^{10} ng/ml, in Kostimulation mit Sp-5,6-DCI-cBiMPS [3 μ M] 4×10^{10} ng/ml.

3.1.2.3.3 Hemmung der IL-6- und Sp-5,6-DCI-cBiMPS-vermittelten pCC-2-luc-Aktivierung

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß eine pCC-2-luc-Aktivierung durch Stimulation mit den Interleukinen IL-1 β und IL-6 sowie durch PKA-aktivierende Substanzen möglich war. Um Aufschluß über die Relevanz der PKA in der Interleukin-induzierten CCL15-Genexpression zu erhalten, wurde erneut der PKA-spezifische Inhibitor Rp-8-CPT-cAMPS verwendet (GJERTSEN *et al.*, 1995). HuH-7 Zellen wurden vor Stimulation mit IL-6 bzw. Sp-5,6-DCI-cBiMPS mit Rp-8-CPT-cAMPS in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Die Konzentrationen von Rp-8-CPT-cAMPS waren so gewählt, daß eine maximal hemmende Wirkung erzielt wurde (asymptotischer Wert des hemmenden Effekts durch schwarze Linien gekennzeichnet). Die resultierende Luciferaseaktivität wurde normalisiert und als relative Aktivität in Prozent angegeben. Hierbei wurde der Basalwert unstimulierter Zellen als 0% und der Maximalwert nach Stimulation als 100% gesetzt. Durch einen Vergleich der verbleibenden Luciferaseaktivität kann Rückschluß auf das Maß der PKA-Beteiligung gezogen werden.

Abbildung 15 zeigt die konzentrationsabhängige Inhibition der IL-6- (grüne Kurve) sowie *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS- (orange Kurve) vermittelten pCC-2-luc-Promotorkonstrukt-Aktivierung durch *Rp*-8-CPT-cAMPS. Es ist ersichtlich, daß *Rp*-8-CPT-cAMPS die *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS-induzierte Promotoraktivität stark reduzieren, jedoch nicht vollständig blockieren kann (Restaktivität 25%). Die IL-6-vermittelte Promotoraktivierung zeigt eine Verringerung um 30 % .

Unter Berücksichtigung, daß *Rp*-8-CPT-cAMPS nicht zu einer vollständigen Blockade des PKA-Signals führt (*Sp*-5,6-DCI-cBiMPS: Restaktivität 25%), ist für die IL-6-induzierte pCC-2-luc-Aktivierung eine Beteiligung der PKA von zirka 45% zu folgern (schwarze Pfeil). Die Frage, ob es sich um eine direkte Beteiligung der PKA an der Interleukin-vermittelten Promotoraktivierung handelt, oder ob PKA nur modulierend einwirkt, wurde in einem weiteren Versuch analysiert.

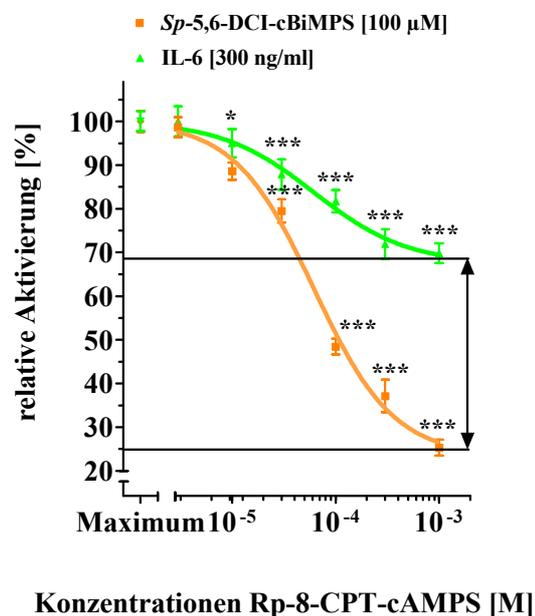


Abbildung 15

Inhibition der IL-6- und Sp-5,6-DCI-cBiMPS-vermittelten pCC-2-luc-Aktivierung durch Rp-8-CPT-cAMPS. Stabil transfizierte HuH-7 Zellen wurden mit Rp-8-CPT-cAMPS in angegebener Konzentration 20 min vorinkubiert und weitere 6 h mit IL-6 [100 ng/ml] bzw. Sp-5,6-DCI-cBiMPS [100 µM] stimuliert. Die Signifikanzen beziehen sich auf den jeweiligen Maximalwert nach IL-6 und Sp-5,6-DCI-cBiMPS-Inkubation (Maximum). Die orange Kurve entspricht der Stimulation mit IL-6, die grüne Kurve der Stimulation mit Sp-5,6-DCI-cBiMPS. Die schwarze Linie spiegelt den extrapolierten asymptotischen Wert des inhibitorischen Effekts wider; der Pfeil stellt die verbleibende Luciferase-Aktivität dar.

3.1.2.3.4 Hemmung der Interleukin-6 - und Ca-vermittelten pCC-2-luc-Aktivierung durch PKI

Bisher konnte durch Verwendung pharmakologisch-wirksamer Substanzen gezeigt werden, daß eine pCC-2-luc-Aktivierung über die PKA möglich ist und diese durch entsprechende Inhibitoren zu hemmen ist. Zudem konnte ein PKA-spezifischer Inhibitor (*Rp*-8-CPT-cAMPS) die durch

Interleukin-1 β (3.1.2.2) und Interleukin-6 (3.1.2.2, 3.1.2.3.3) induzierte Promotoraktivierung reduzieren. Die PKA könnte direkt durch IL-6 aktiviert werden und somit über den PKA-Signalweg zu der pCC-2-luc-Induktion beitragen. Desweiteren besteht die Möglichkeit, daß die PKA den IL-6-Signalweg und so die Promotoraktivierung über modulierende Mechanismen beeinflusst und keine direkte Beteiligung des PKA-Signalwegs vorliegt.

Die Rolle der PKA an der IL-6-vermittelten Promotorinduktion wurde im folgenden untersucht. Hierzu wurden Expressionsplasmide genutzt, die für C α , ein Isoenzym der katalytischen Untereinheit der PKA (HOWARD *et al.*, 1991) und den Protein-Kinase-Inhibitor (PKI) kodieren. PKI wirkt als kompetitiver Inhibitor der PKA (DAY *et al.*, 1989). HuH-7 Zellen wurden transient mit pCC-2-luc, C α und PKI in verschiedenen Kombinationen (Abb. 16) kotransfiziert und mit IL-6 stimuliert.

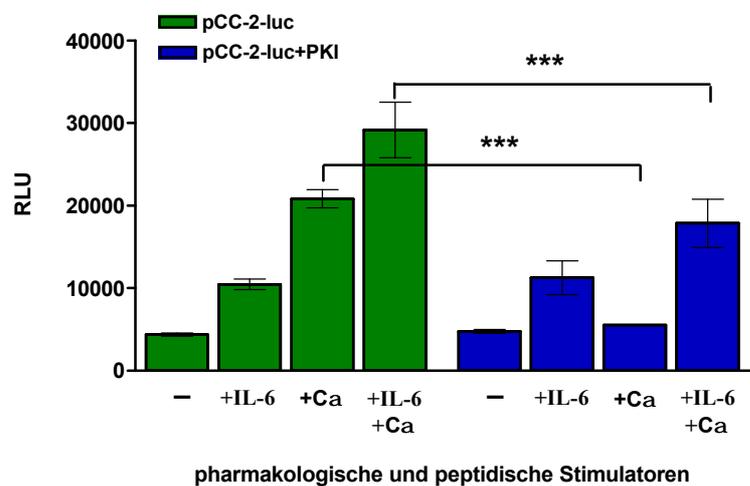


Abbildung 16

Hemmung der IL-6- und Ca-vermittelten pCC-2-luc-Aktivierung durch PKI. HuH-7 Zellen wurden transient mit pCC-2-luc transfiziert sowie mit Expressionsplasmiden die für Ca und PKI kodieren, kotransfiziert. Anschließend erfolgte für 6 h eine Stimulation mit IL-6 [300 ng/ml]. Die Linien kennzeichnen die miteinander verglichenen, signifikant unterschiedlichen Werte.

Die IL-6-Stimulation transient mit pCC-2-luc transfizierter HuH-7 Zellen führt, wie auch die Kotransfektion mit C α , zu einem deutlichen Anstieg der Luciferaseaktivität (Abb. 16). Die Inkubation kotransfizierter Zellen mit IL-6 resultiert in einem additiven stimulatorischen Effekt (Abb. 16). Die zusätzliche Transfektion von PKI führt zu einer fast vollständigen Reduktion der C α -induzierten Promotorinduktion. Die resultierende Luciferaseaktivität nach Transfektion mit C α und anschließender Stimulation mit IL-6 wird durch PKI signifikant gehemmt. PKI führt jedoch zu keiner signifikanten Hemmung der IL-6-medierten Aktivierung. Das IL-6-Signal scheint demnach nicht über die PKA-Signalkaskade weitergeleitet zu werden.

Insgesamt wurde gezeigt, daß eine Promotoraktivierung direkt über den PKA-Signalweg möglich ist (Aktivierung von pCC-2-luc durch C α). Die Daten (keine Hemmung der IL-6-mediierten pCC-2-luc-Aktivierung durch PKI) weisen darauf hin, daß die IL-6-induzierte pCC-2-luc-Aktivierung jedoch nicht direkt über den PKA-Signalweg vermittelt wird. Es ist eine Interaktion zwischen der PKA und dem IL-6-Signalweg zu vermuten, die modulierend die pCC-2-luc-Aktivität beeinflusst.

3.1.3 Analyse der endogenen CCL15-Expression nach Interleukin-Stimulation

Die mittels Reportergen Test generierten Daten zeigen in HuH-7 Zellen eine pCC-2-luc-Promotor-konstrukt-Induktion durch die Interleukine IL-1 β und IL-6 sowie in geringerem Maß durch die Interferone IFN- α und IFN- γ . Der Entschluß die Signalweiterleitung der Interleukin-vermittelten Promotorinduktion zu untersuchen, resultierte aus der Vermutung einer möglichen Beteiligung von CCL15 an akuten oder chronischen Entzündungsprozessen der Leber. Zur Identifizierung der endogenen CCL15-Expression im Zeitverlauf wurde die endogenen Genexpression nach Interleukin-Stimulation zu verschiedenen Zeitpunkten mit verschiedenen Methoden quantifiziert.

3.1.3.1 Bestimmung der CCL15-Expression mittels semi-quantitativer RT-PCR

Für den Nachweis endogener CCL15-Transkription nach Stimulation mit Interleukinen wurde eine semi-quantitative Bestimmung durchgeführt. Hierfür wurden von IL-1 β -stimulierten [1 ng/ml] und unstimulierten HuH-7 Zellen cDNA Proben mittels RT-PCR analysiert (siehe 2.3.4.2). Ausgehend von einer möglichen Beteiligung in der akuten Entzündung wurden Stimulationszeiten von 5, 10 und 20 min gewählt, da in dieser Zeit die vermehrte Bildung des CCL15-Transkripts vermutet wurde. Die drei gewählten Zeitpunkte sollten Aufschluß über den zeitlichen Verlauf der CCL15-Expression geben. Die Amplifikationsprodukte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, dokumentiert und das Areal der detektierten Banden des CCL15-cDNA Fragments planimetrisch ausgewertet (siehe 2.5) und als relative Fläche angegeben.

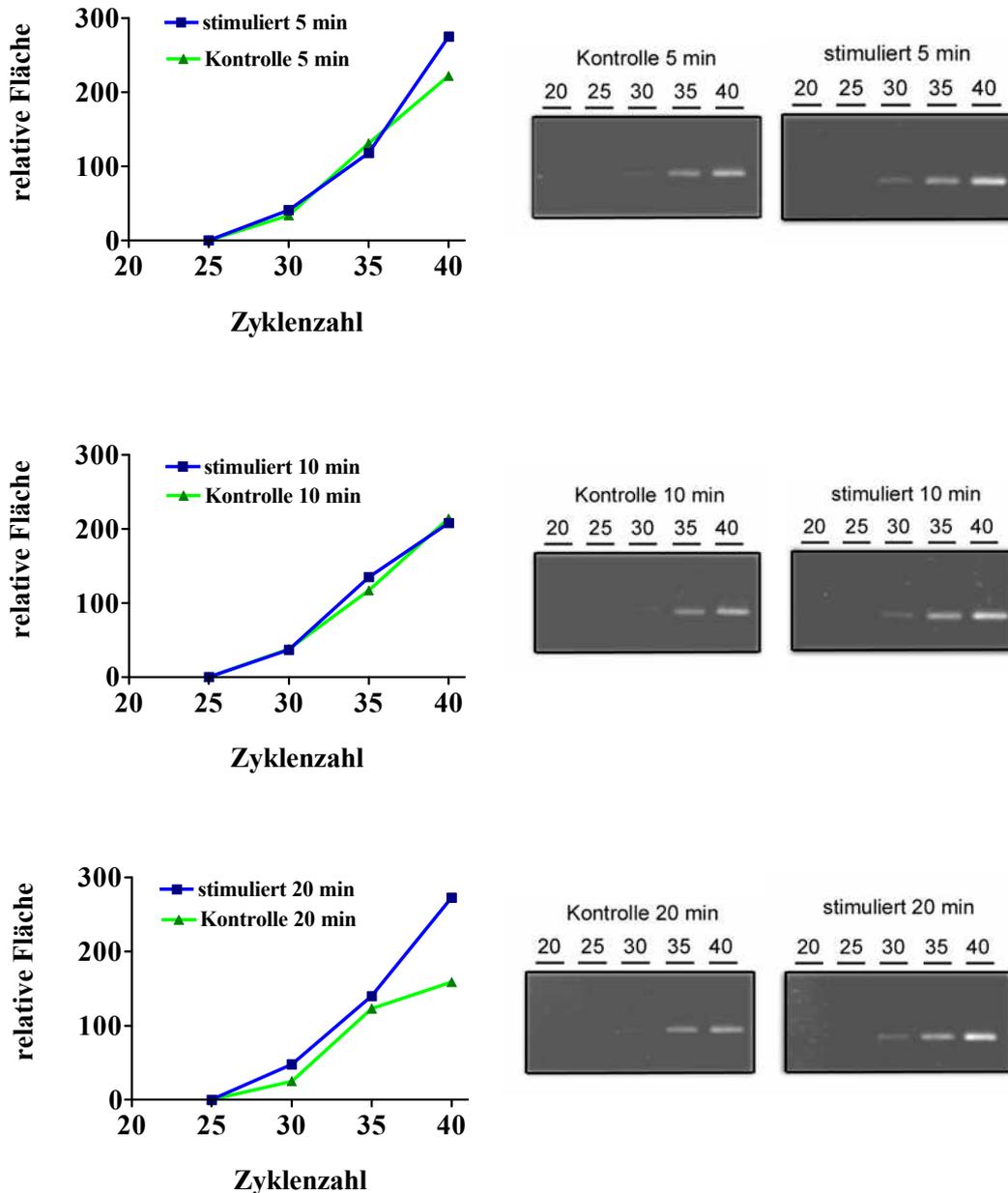


Abbildung 17

Analyse der endogenen CCL15-Expression nach Interleukin-Stimulation in HuH-7 Zellen. Es wurden cDNA-Proben von HuH-7 Zellen, die für 5, 10 und 20 min mit Interleukin-1 β stimuliert waren, mittels RT-PCR getestet. Als Kontrolle dienen cDNA Proben unstimulierter Zellen. Nach jeweils 25, 30, 35 und 40 Zyklen wurden 10 μ l des jeweiligen PCR-Ansatzes in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt ist die planimetrische Auswertung der detektierten spezifischen Banden des CCL15-Fragments; die Ergebnisse sind als relative Fläche angegeben.

Aus Abbildung 17 geht hervor, daß eine erhöhte CCL15-Expression durch IL-1 β -Stimulation mit semi-quantitativer RT-PCR-Analysen nicht nachweisbar war. Bei einer PCR-Reaktion kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der Zielsequenz. Die cDNA-Amplifikate (Abb. 17, 20 min) nach 25, 30 und 35 Zyklen weisen gleiche Mengen auf, so daß die Divergenz nach 40 Zyklen als "Ausreißer" anzusehen ist und nicht als stimulatorischer Effekt des Interleukins.

3.1.3.2 Relative Quantifizierung der CCL15-Aktivierung mit dem TaqMan™

Die im Luciferase-Reportergen Test eindeutig nachgewiesene pCC-2-luc-Aktivierung nach Interleukin-Inkubation konnte durch eine Bestimmung der Transkriptmenge mittels semi-quantitativer RT-PCR nicht verifiziert werden. Daher wurde die hoch sensible und spezifische TaqMan-Methode (siehe 2.3.4.3) verwendet, die eine direkte und genaue zeitliche Quantifizierung der mRNA ermöglicht. Hierfür wurden cDNA Proben Interleukin-stimulierter HuH-7 Zellen verwendet. Als Kontrolle dienten unstimulierte HuH-7 Zellen. Die Stimulationszeiten betragen 5, 10 und 20 min, die Konzentration von IL-1 β lag bei 1 ng/ml und von IL-6 bei 300 ng/ml. Zur relativen Quantifizierung der Proben wurde die CCL15-Expression durch Abgleich mit der Expression des internen Standards GAPDH normalisiert und anschließend der Stimulationsfaktor berechnet (siehe 2.3.4.3.2). Die in Abbildung 18A und 18B dargestellten Stimulationsfaktoren geben die Zunahme der Genexpression nach Interleukin-Inkubation an. Ein Stimulationsfaktor von zwei würde demnach einer Verdopplung der Transkriptmenge nach Stimulation entsprechen, bei einem Stimulationsfaktor von eins wäre keine Zunahme detektierbar.

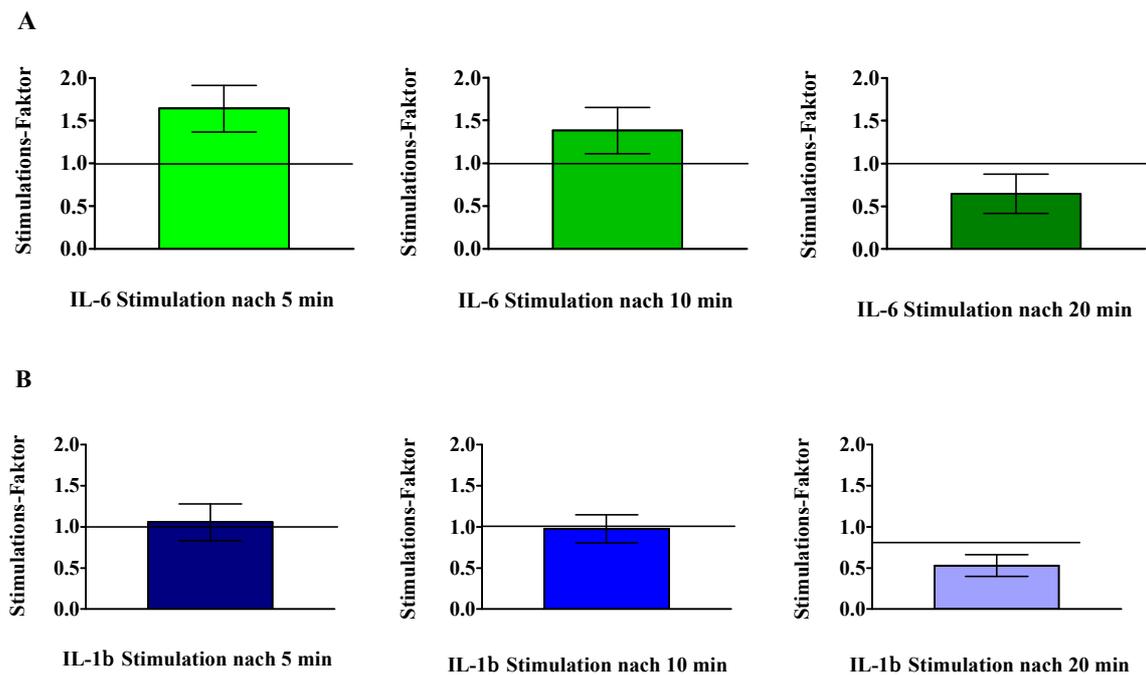


Abbildung 18

Analyse der CCL15-Genexpression nach Interleukin-Stimulation in HuH-7 Zellen. Gezeigt ist der mit der DDC_T Methode ermittelte Stimulationsfaktor nach Inkubation mit IL-1 β [1 ng/ml] (A) bzw. IL-6 [300 ng/ml] (B) nach 5, 10 und 20 min.

Die Interleukin-vermittelte CCL15-Expression konnte mit semi-quantitativer RT-PCR (3.1.3.1) nicht nachgewiesen werden. Auch die hochsensitive *TaqMan*-Analyse kann nach Bestimmung des Stimulationsfaktors keinen Effekt von IL-1 β oder IL-6 auf die CCL15-Genexpression zeigen (Abb. 18). Der Stimulationsfaktor von 1,5 nach 5 min IL-6-Stimulation (Abb. 18A) stellt zwar eine schwache Erhöhung dar, die jedoch nicht einmal einer Verdopplung der Basalaktivität entspricht. Akut-Phase-Proteine, wie zum Beispiel das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP), ist im Rahmen einer Akut-Phase-Reaktion um das 30-fache erhöht. Im Vergleich dazu ist die hier detektierte geringe Zunahme nicht als stimulatorischer Effekt zu werten. Die Daten spiegeln somit nicht die im Reporter-Gen Test gezeigten stimulatorischen Effekte der Interleukine auf das pCC-2-luc Promotor-konstrukt wider.

3.1.3.3 Analyse der CCL15-Aktivierung mittels Radioimmuntest (RIA)

Die zu erwartende Induktion der CCL15-Expression durch die Interleukine IL-1 β und IL-6 konnte weder durch semi-quantitative RT-PCR (3.1.3.1) noch durch *TaqMan*-Analyse (3.1.3.2) detektiert werden. Es wurde nun versucht, den Gehalt an CCL15-Peptid mittels Radioimmuntest ("Radioimmunoassay" (RIA)) nachzuweisen und somit den stimulatorischen Effekt von Interleukin-1 β . Hierzu wurden HuH-7 Zellen mit IL-1 β [1 ng/ml] inkubiert und Überstand nach 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h entnommen; als Kontrolle diente der Überstand unstimulierter Zellen. Zur Quantifizierung wurden die ermittelten Werte auf einen CCL15-Standard (prozessierte Form CCL15₄₈₋₁₁₃) abgeglichen.

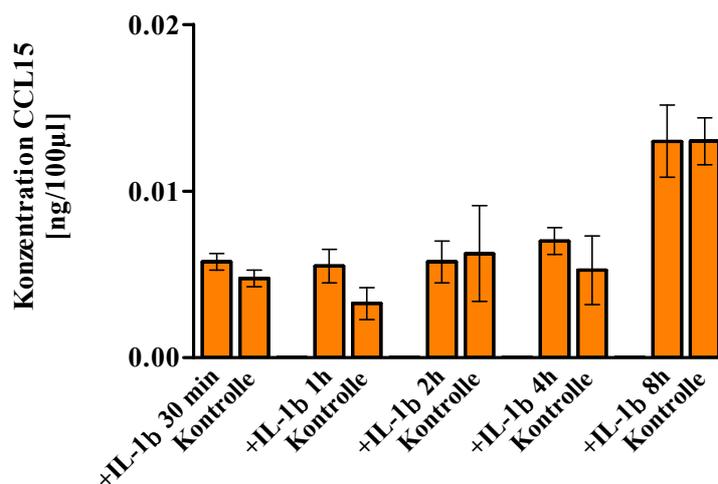


Abbildung 19

Bestimmung der Peptidmenge an CCL15 im Medium von IL-1 β stimulierten HuH-7 Zellen. Nach IL-1 β -Inkubation [1 ng/ml] wurde an fünf Zeitpunkten (30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h) Überstand abgenommen und im RIA auf den Peptidgehalt an CCL15 untersucht. Als Kontrolle diente der Überstand unstimulierter HuH-7 Zellen. Die ermittelte Peptidmenge ist in [ng/100 μ l] angegeben.

Aus Abbildung 19 geht hervor, daß kein signifikanter Unterschied des CCL15-Peptidgehalts im Zellüberstand stimulierter und unstimulierter HuH-7 Zellen im RIA nachweisbar ist ($p > 0,05$ nach Bonferroni's Multiple Comparison Test). Es kann zwar eine Konzentrationszunahme an CCL15 nach 8 h detektiert werden, diese ist jedoch in stimulierten wie unstimulierten Proben gleich. Die Daten stimmen mit den Ergebnissen der *TaqMan*-Analyse und der semi-quantitativen RT-PCR überein. Somit stehen auch sie im Widerspruch zu den Ergebnissen des Reportergergen Tests. Um eine Erklärung für die Divergenz in den Daten zu erhalten, wurde der potentielle Promotorbereich von pCC-2-luc mittels bioinformatischer Promotoranalyse untersucht.

3.1.3.4 Bioinformatische Analyse des potentiellen Promotorbereichs von CCL15

Im Reportergergen Test wurde eine pCC-2-luc-Aktivierung durch die Interleukine IL-1 β und IL-6 gezeigt. Eine erhöhte Menge an CCL15-Transkript oder Protein nach Inkubation mit IL-1 β oder IL-6 konnte mit Hilfe anderer Analysetechniken (RT-PCR, *TaqMan*TM, RIA) jedoch nicht detektiert werden. Der Reportergergen Test beruht auf signalvermittelter Promotoraktivierung und anschließender Luciferase-Expression, meßbar als Lichtemission. An der Promotoraktivierung sind regulatorische DNA-Bindungsproteine beteiligt, die an spezifische DNA-Sequenzen assoziieren und so die Expression der Promotor-kontrollierten Gene modulieren. Die Identifizierung putativer regulatorischer Sequenzen im Promotorbereich von pCC-2-luc sollte Aufschluß über den kausalen Zusammenhang von Interleukin-Stimulation und Promotoraktivierung geben.

Das genutzte Reportergergenkonstrukt pCC-2-luc wurde 1996 kloniert und enthält eine potentielle Promotorsequenz des CCL15 Gens von 886 bp (PARDIGOL Dissertationsschrift 1996). Im Bereich dieser Sequenz wurden putative Bindungsmotive für die Transkriptionsfaktoren IRF-2, ELK-1 und YY-1 (PARDIGOL *et al.* 1998) sowie ROR α , COUP-TF, E47, AP-4, IK-3, TCF-2 α , TEF-1 β und ISGF-3 detektiert (Pardigol Dissertationsschrift 1996). Eine weitere Analyse wurde von FORSSMANN *et al.* (2001) durchgeführt. Es wurden mehrere potentielle Bindungselemente für Transkriptionsfaktoren ermittelt, die in der Immunmodulation und Entzündungsreaktionen beteiligt sind, wie Ikaros-Faktoren, AP1FJ, STAT und NF κ B (FORSSMANN *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit wurde die Sequenz des klonierten potentiellen Promotorbereichs zur Verifizierung mit einer neueren Version des Programm MatInspector (V.2.2.) basierend auf TRANSFAC 4.0 (QUANDT *et al.*, 1995) auf putative responsive Promotorelemente untersucht. Insgesamt ermittelte das Programm über 250 mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Für manche Elemente wurden nur vier oder fünf Basen als Kriterium für eine Übereinstimmung verwendet; diese sind aufgrund der geringen Sequenzidentität in dem Modell nicht dargestellt.

Abbildung 20 zeigt, daß ein Großteil der ermittelten Bindungsmotive mit denen von FORSSMANN *et al.* (2001) übereinstimmt. Zusätzlich wurden eine weitere TATA-Box sowie DNA-Sequenzen für die

regulatorischen Bindungsproteine C/EBP β und AP-1 detektiert. Anschließend wurde die potentielle Promotorsequenz von 886 bp mit Hilfe von BLAST-Suchen (ALTSCHUL *et al.*, 1997) mit eingetragenen Sequenzen verglichen.

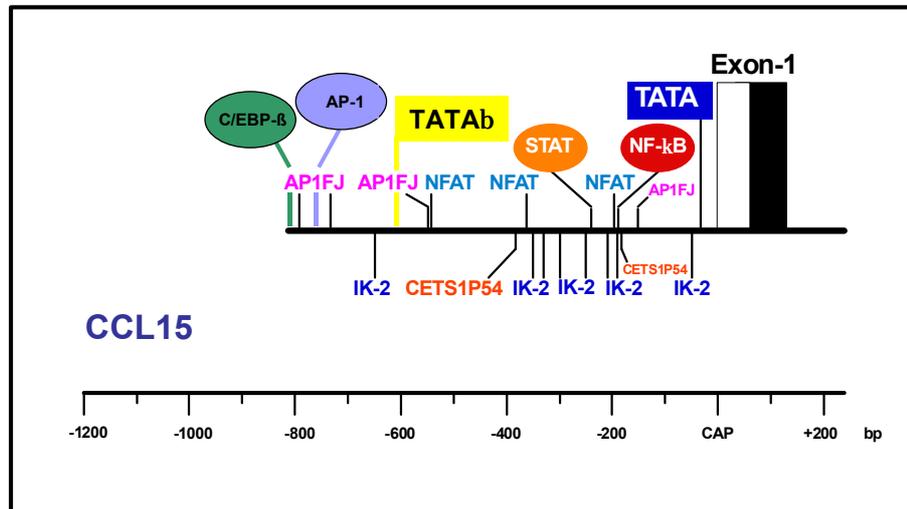


Abbildung 20

*Erweiterte Darstellung putativer responsiver Elemente des Promotors von CCL15 (nach FORSSMANN *et al.*, 2001). Die Positionen der putativen regulatorischen Elemente wurde durch das Programm MatInspector bestimmt und beziehen sich auf den ermittelten Transkriptionsstartpunkt. C/EBP β : CAAT/Enhancer binding protein β , AP-1: Activator-Protein-1, AP1FJ: Activator-Protein-1 Fos-Jun, NFAT: Nuclear factor of activated T cells, IK-2: Ikaros-2-Element, STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription, NF κ B: Nuclear Factor- κ B, TATA α : bekannte TATA-Box, TATAb: neu ermittelte TATA-Box, CAP: Cap-Struktur.*

Aus Abbildung 21 geht hervor, daß der Sequenzvergleich mit den angegebenen NCBI-Einträgen ab einer Position von 296 bp mehrere EST-Sequenzen ("expressed sequence tags") aufweist, die in der Analyse von Pardigol nicht detektiert wurden (PARDIGOL Dissertationsschrift 1996). Hierbei handelt es sich um cDNA-Sequenzen, die ausreichend sind zur Identifizierung des kodierenden Abschnitts eines Gens. Die mittels BLAST-Suche detektierten EST-Klone umfassen den Bereich von -293 bp bis zum Ende des putativen Promotors bzw. bis in das erste Exon hinein. Da cDNA der mRNA eines Genabschnitts entspricht, enthält sie weder Intron- noch Promotorsequenzen. In der potentiellen Promotorsequenz von CCL15 dürften demnach keine EST-Klone lokalisiert sein. Ausgehend von der Identifizierung der EST-Sequenzen kann vermutet werden, daß die eigentlichen regulatorischen DNA-Sequenzen im Bereich von 1-292 bp liegen. Durch die Deletion dieser Sequenzregion sollte Aufschluß über die Relevanz der dort lokalisierten Bindungselemente (AP-1, C/EBP) sowie der detektierten TATA β -Box erhalten werden.

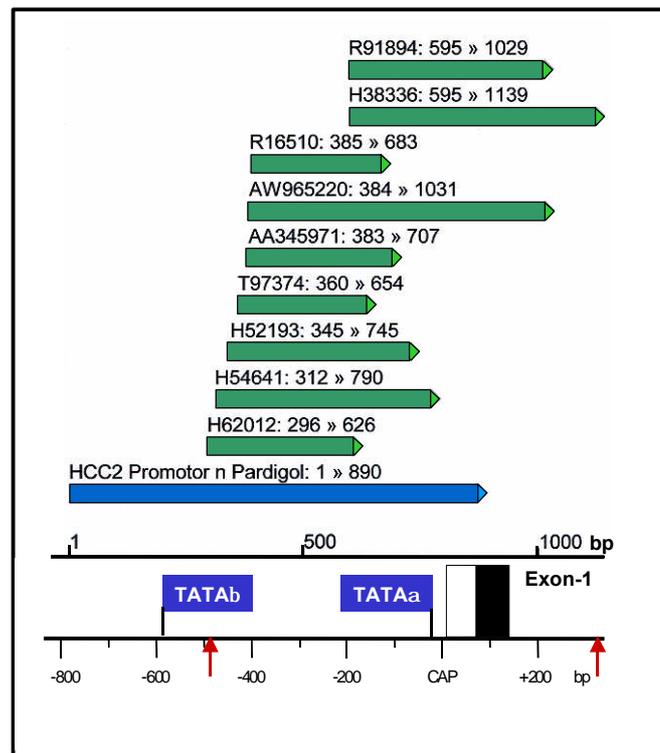


Abbildung 21

Lokalisierung der mittels BLAST-Suche ermittelten EST-Klone auf der Promotorsequenz von pCC-2-luc. Die Sequenz umfaßt den potentiellen Promotorbereich von 890 bp (blau) und eine Teilsequenz des ersten Exons (markiert durch die roten Pfeile). Die grünen Blockpfeile kennzeichnen die detektierten EST-Sequenzen, der jeweilige Sequenzbereich und die dazugehörigen NCBI-Einträge sind angegeben.

3.1.3.5 Erstellung des Luciferase-Reportergenkonstrukts Δ pCC-2-luc

Die bioinformatische Promotoranalyse führt zu der Annahme, daß der Sequenzbereich bis 296 bp für die Regulation der Interleukin-vermittelten pCC-2-luc-Aktivierung relevant ist. Dieser Bereich enthält regulatorische Bindungselemente für die Transkriptionsfaktoren AP-1, C/EBP sowie die TATAβ-Box. Die Deletion dieses Bereichs ließ eine veränderte, reduzierte pCC-2-luc-Aktivierung nach Stimulation mit IL-1β und IL-6 erwarten. Zur Überprüfung der Annahme wurde ausgehend von pCC-2-luc ein weiteres Luciferase-Reportergenkonstrukt mit verkürzter Promotorregion erstellt, Δ pCC-2-luc. Dem Konstrukt Δ pCC-2-luc fehlen die regulatorischen DNA-Bindungssequenzen für AP-1 und C/EBP sowie die stromaufwärts gelegene TATAβ-Box (220-226 bp). Die verbleibende Sequenz im Promotorbereich entspricht den durch BLAST-Suchen ermittelten EST-Sequenzen.

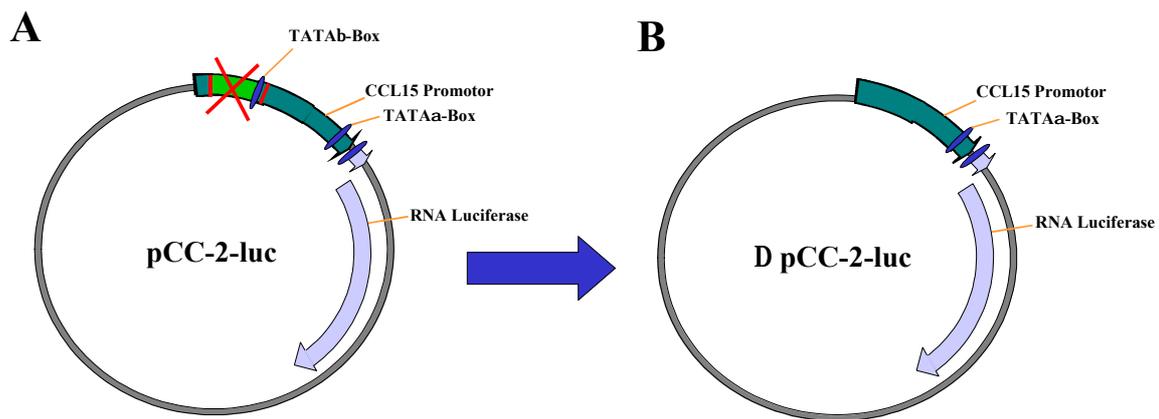


Abbildung 22

Vektordarstellung von *pCC-2-luc* und *DpCC-2-luc*. A: *pCC-2-luc* mit dem Luciferasegen und dem vorgeschalteten potentiellen Promotorbereich von *CCL15*. Markiert sind die beiden TATA-Boxen **a** und **b**, das Kreuz kennzeichnet den zu deletierenden Bereich in der Promotorsequenz. B: Verkürztes Promotorkonstrukt *DpCC-2-luc*. Die verbleibende TATA**a**-Box in der Promotorregion ist angezeigt.

Abbildung 23A und B zeigen das Prinzip, mit der das verkürzte Konstrukt $\Delta pCC-2-luc$ generiert wurde. A: Für die Konstruktion von $\Delta pCC-2-luc$ wurden in unabhängigen Standard-PCR-Reaktionen (siehe 2.3.4.1) mit den Oligonukleotidpaaren Jump1-for / Jump1-rev und Jump2-for / Jump2-rev zwei DNA-Fragmente aus dem Konstrukt *pCC-2-luc* amplifiziert, die 216 bp voneinander entfernt lokalisiert waren. Der Bereich von 216 bp entsprach der zu deletierenden Sequenz. Die verwendeten Oligonukleotidpaare waren so konstruiert, daß ein Oligonukleotid ("Jump1-rev") am 3'-Ende einen komplementären Sequenzabschnitt zu dem Oligonukleotid des anderen Paares ("Jump2-for") aufwies. Die entstandenen Amplifikationsprodukte enthielten somit eine identische Sequenzregion. In einer dritten PCR-Reaktion wurden die beiden generierten Fragmente als DNA-Matrize verwendet und die Oligonukleotide Jump1-for und Jump2-rev eingesetzt. Bei der Denaturierung während der PCR konnten diese in der komplementären Region hybridisieren und wurde anschließend amplifiziert. Das so generierte cDNA-Fragment enthielt Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *KpnI* und *PstI*. Das Amplifikationsprodukt wurde in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.3.3.1), das DNA-Fragment aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt (siehe 2.3.1.3). B: Das generierte Fragment wurde, wie auch *pCC-2-luc*, mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *PstI* hydrolytisch gespalten (siehe 2.2.2.5). Das geschnittene cDNA-Fragment wurde anschließend mit dem gespaltenen Vektor *pCC-2-luc* zu dem neuen Konstrukt $\Delta pCC-2-luc$ ligiert (siehe 2.2.2.2). Der Sequenzbereich von 216 bp, der ursprünglich zwischen den Amplifikationsprodukten lag, wurde hiermit eliminiert. Die TATA β -Box sowie die Bindungselemente für AP-1 und C/EBP fehlen. In einer abschließenden Sequenzanalyse (siehe 2.3.5.1) des $\Delta pCC-2-luc$ -Konstrukts wurde die korrekte Deletion des gewünschten Sequenzbereichs bestätigt und nachgewiesen, daß keine Mutationen vorliegen.

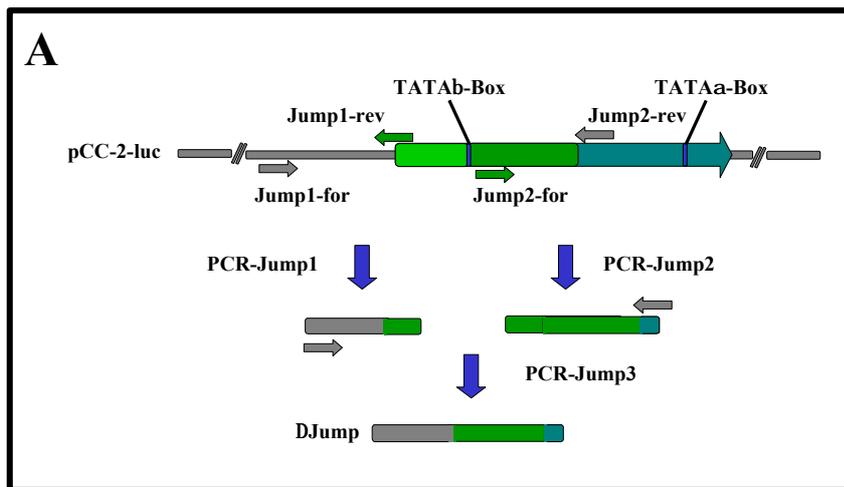


Abbildung 23

Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Herstellung des Konstrukts **DpCC-2-luc**. A: Das Prinzip basiert auf der Deletion eines Sequenzbereichs mittels PCR. In zwei unabhängigen PCR-Reaktionen wurden zwei cDNA-Fragmente aus dem **pCC-2-luc** Konstrukt generiert. Die Amplifikate liegen 216 bp voneinander entfernt, was dem zu deletierenden Bereich entspricht. Die Oligonukleotide **Jump1-rev** und **Jump2-for** besaßen überhängende Enden, die zueinander komplementär sind. Aufgrund dieser Eigenschaft hybridisieren die beiden Fragmente in einer dritten PCR in den komplementären Regionen, woraus das verlängerte Fragment **DJump** entsteht. Dem generierten Fragment fehlen 216 bp der Promotorregion von **pCC-2-luc**.

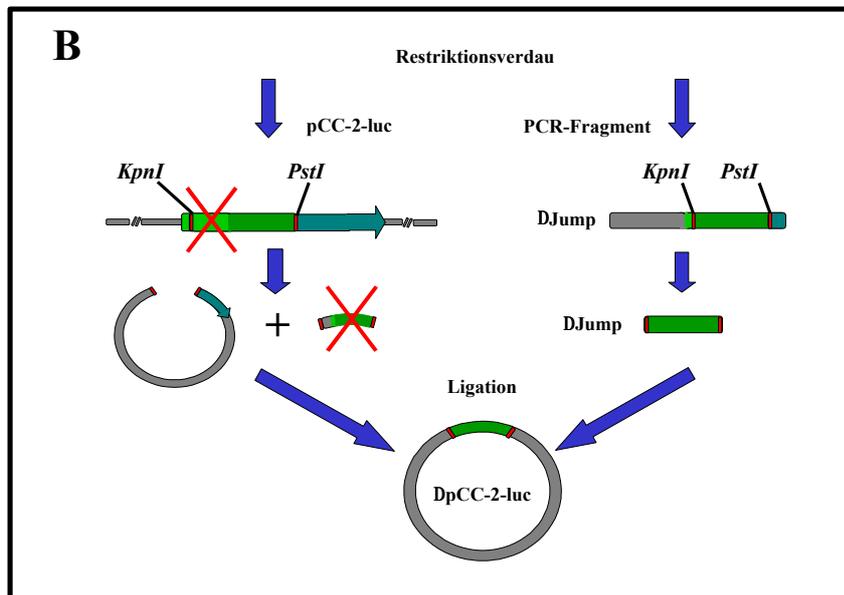


Abbildung 23

Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Herstellung des Konstrukts **DpCC-2-luc**. B: Das generierte cDNA-Fragment war so konzipiert, daß es Schnittstellen für die Restriktionsenzyme **KpnI** und **PstI** enthielt, wie auch das Konstrukt **pCC-2-luc**. Das cDNA-Fragment und **pCC-2-luc** wurden durch die Restriktionsenzyme hydrolytisch gespalten. Bei **pCC-2-luc** wurde ein Sequenzbereich der Promotorregion herausgeschnitten, der die zu deletierenden 216 bp noch beinhaltet. Das mittels PCR zuvor neu generierte cDNA-Fragment enthielt diesen Bereich nicht mehr. Aufgrund gleicher Schnittstellen konnte das Fragment **DJump** und der Vektor in einer anschließenden Ligation zu dem Konstrukt **DpCC-2-luc** zusammengefügt werden, dessen Promotorbereich um 216 bp verkürzt ist.

3.1.3.6 Aktivitätsvergleich von pCC-2-luc und DpCC-2-luc

Aus der bioinformatischen Analyse resultiert die Vermutung, daß AP-1 und C/EBP β wichtige regulatorische Bindungsproteine im Promotorbereich von pCC-2-luc sind. Es wurde das Konstrukt Δ pCC-2-luc generiert, dem diese DNA-Bindungssequenzen fehlt, so daß eine reduzierte signalvermittelte Promotoraktivierung von Δ pCC-2-luc gegenüber pCC-2-luc zu erwarten war. Zur Überprüfung wurden HuH-7 Zellen parallel mit pCC-2-luc und Δ pCC-2-luc transient transfiziert und anschließend mit IL-1 β , Forskolin sowie mit IL-1 β und Forskolin stimuliert.

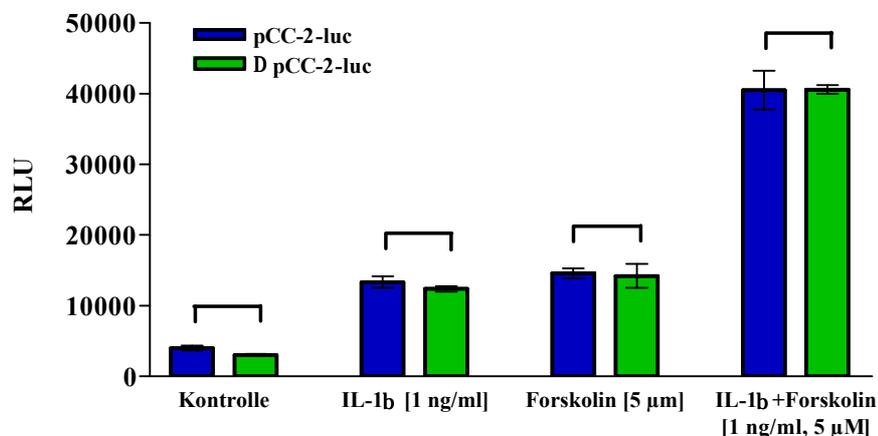


Abbildung 24

Aktivitätsvergleich von pCC-2-luc und DpCC-2-luc. HuH-7 Zellen wurden mit pCC-2-luc sowie DpCC-2-luc transient transfiziert und für 6 h mit IL-1 β [1 ng/ml], Forskolin [5 μ M] sowie mit IL-1 β und Forskolin stimuliert. Die resultierende Luciferaseaktivität ist in RLU angegeben; als Kontrolle dient die Basalaktivität unstimulierter Zellen. Die Klammern kennzeichnen miteinander verglichene Werte.

Abbildung 24 zeigt, daß die Basalaktivität der Promotorkonstrukte pCC-2-luc und Δ pCC-2-luc nicht signifikant unterschiedlich ist ($p > 0.05$ nach Bonferroni's Multiple Comparison Test). Auch Stimulationen mit IL-1 β und Forskolin allein, sowie in Kombination, zeigen keine signifikanten Abweichungen in der Luciferaseaktivität. Die Deletion der AP-1- und C/EBP β -DNA-Bindungsmotive sowie der TATA β -Box hat demnach keinen Einfluß auf die Interleukin- und PKA-vermittelte Promotoraktivierung. Die Vermutung, AP-1 und C/EBP β seien Schlüsselemente der pCC-2-luc-Aktivierung kann somit nicht belegt werden. Es ist anzunehmen, daß in dem verbleibenden Sequenzbereich weitere wichtige regulatorische Elemente lokalisiert waren.

3.2 Signaltransduktionsanalysen zur Aktivierung des humanen *Period1*-Gens (*hPer1*)

3.2.1 Untersuchungen der Induktion des humanen *Period1*-Gens (*hPer1*) in der humanen Hepatoma Zelllinie HuH-7

Bisherige Untersuchungen der CCL15-Genexpression wurden in der humanen Hepatoma Zelllinie HuH-7 mittels Luciferase-Reportergen Test sowie quantitativer, semi-quantitativer RT-PCR und RIA durchgeführt. Hierbei kam es zu Differenzen zwischen der endogenen Genexpression und der induzierten Promotoraktivierung im Luciferase-Reportergen Test. Studien von MOTZKUS *et al.* (2000) konnten unter der Verwendung des Promotorkonstrukts *hPER1-luc* ein stabiles Reportergen Testsystem zeigen. Hierbei entsprach die endogene Transkriptionsregulation eindeutig den im Luciferase-Reportergen Test gewonnenen Daten. Die weiteren Signaltransduktionsanalysen dieser Arbeit wurden aufgrund dessen mit dem *hPER1-luc* Promotorkonstrukt in HuH-7 Zellen durchgeführt. Die Untersuchungen befaßten sich mit der Transaktivierung des humanen Gens *Period1* (*hPer1*), das an der molekularen Regulation der inneren Uhr beteiligt ist.

3.2.1.1 Molekulare Regulationsmechanismen der zirkadianen Zentraluhr

Zahlreiche Organismen besitzen tagesperiodische Aktivitätszyklen, die als zirkadiane Rhythmen bezeichnet werden und durch eine zentrale innere Uhr erzeugt und mit dem 24 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus der Umwelt synchronisiert werden (KLEIN *et al.*, 1991). Die zentrale innere Uhr ist bei Säugetieren im Nucleus Suprachiasmaticus (SCN) des Hypothalamus lokalisiert (REPPERT und WEAVER 2001). Zirkadiane Uhren scheinen zudem in einigen peripheren Geweben aufzutreten, die über den SCN synchronisiert werden (BALSALOBRE *et al.*, 1998, ZYLKA *et al.*, 1998, MOTZKUS *et al.*, 2000, MOTZKUS *et al.*, 2002, MOTZKUS & MARONDE 2003 in Druck). Der Oszillator der inneren Uhr ist vermutlich aus verschiedenen Proteinen aufgebaut, deren Gene tagesrhythmisch exprimiert werden und dem Prinzip der negativen Rückkopplung folgen (siehe 1.5).

Untersuchungen der *hPer1*-Expression sollen Hinweise auf weitere beteiligte regulatorische Elemente und Mechanismen des Oszillatorsystems geben. Als biologisches Testsystem wurde für die Untersuchung ein Luciferase-Reportergen Test genutzt, der reproduzierbar die endogenen Regulationsmechanismen widerspiegelt. Das verwendete Luciferase-Reportergenkonstrukt *hPER1-luc* wurde 1999 von Dirk Motzkus kloniert und enthält einen Bereich von 1347 bp der Promotorregion des *hPer1*-Gens sowie auch 3'-liegende Bereiche, die bis in das Exon 4 reichen (MOTZKUS Dissertationsschrift 2001). MOTZKUS *et al.* zeigten 2000 zudem, daß die *hPer1*-Expression in HuH-7 Zellen unabhängig voneinander durch den PKA- und PKC-Signalweg induziert werden kann. In den folgenden Untersuchungen wurde zuerst die CLOCK/BMAL1-abhängige Aktivierung von *hPER1-luc*

und anschließend die CLOCK/BMAL1-unabhängige Promotoraktivierung über den PKA- und PKC-Signalweg analysiert.

3.2.1.2 Molekulare Regulationsmechanismen der *hPER1-luc*-Aktivierung via *CLOCK* und *BMAL1*

3.2.1.3 Aktivierung von *hPER1-luc* durch *CLOCK* und *BMAL1*

Zur Charakterisierung der endogenen Regulationsmechanismen in einem Leberzellensystem wurden Zellen der humanen Hepatoma Zelllinie (HuH-7) transient mit dem *hPER1-luc* Konstrukt sowie mit Expressionsplasmiden die für murines *CLOCK*, *BMAL1* und *CRY2* kodieren, kotransfiziert. Es wurden konstante Mengen Plasmid-DNA eingesetzt. Die Expressionsplasmide wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von GREGOR EICHELE (MPI für experimentelle Endokrinologie, Hannover) zur Verfügung gestellt.

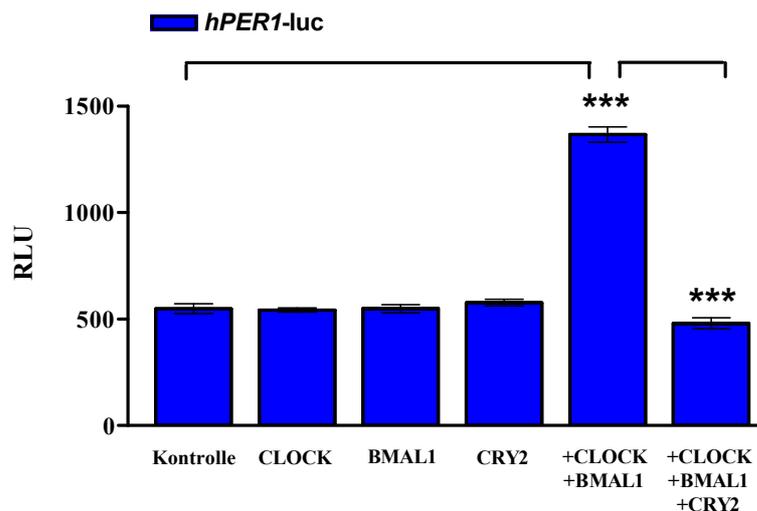


Abbildung 25

Aktivierung von hPER1-luc durch CLOCK und BMAL1 sowie Inhibition des Effekts durch CRY2. HuH-7 Zellen wurden mit dem hPER1-luc Promotorkonstrukt allein oder mit Plasmiden, die für CLOCK, BMAL1 und CRY2 kodieren, kotransfiziert. Die Linien verbinden die signifikant unterschiedlichen Werte.

Die Daten zeigen, daß es sich bei diesem biologischen System um ein komplettes peripheres zirkadianes System handelt (Abb. 25). Die von KUME *et al.* (1998) beschriebenen endogenen Regulationsmechanismen des zentralen Oszillatorsystems konnten in HuH-7 Zellen nachgewiesen werden. Es wurde eine Aktivierung von *hPER1-luc* durch die Transaktivatoren *CLOCK* und *BMAL1* gezeigt, sowie eine komplette Inhibition der *CLOCK/BMAL1*-induzierten *hPER1-luc*-Aktivierung durch *CRY2*. Kotransfektionen mit *CLOCK* alleine und *BMAL1* allein hat keinen Einfluß auf die Promotoraktivierung von *hPER1-luc*. Zur Validierung der Daten wurde der inhibitorische Effekt von *CRY2* auf Konzentrationsabhängigkeit getestet.

3.2.1.4 Hemmung der *hPER1-luc*-Aktivierung durch Cryptochrom

Der Mechanismus der negativen Rückkopplung hängt entscheidend von der vorhandenen Menge an Protein ab, so daß eine konzentrationsabhängige Wirkung von CRY2 zu erwarten war. Für die Analyse der Konzentrationsabhängigkeit von CRY2 wurden HuH-7 Zellen transient mit *hPER1-luc* transfiziert. In parallelen Kotransfektionen wurden zusätzlich zu *hPER1-luc* Expressionsplasmide eingesetzt, die für CLOCK, BMAL1 und CRY2 kodieren. CRY2 wurde in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt.

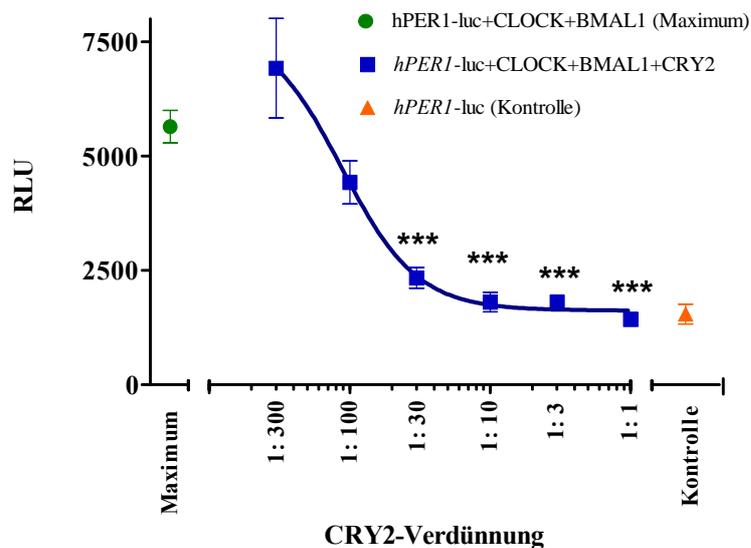


Abbildung 26

Inhibition von CLOCK/BMAL1-vermittelter hPER1-luc-Aktivierung durch CRY2. HuH-7 Zellen wurden mit hPER1-luc und Plasmiden, die für CLOCK, BMAL1 und CRY2 kodieren, transient kotransfiziert. CRY2 wurde konzentrationsabhängig eingesetzt. Die Signifikanzen nehmen Bezug auf die Luciferaseaktivität nach Kotransfektion mit hPER1-luc (Kontrolle), CLOCK und BMAL1 (Maximum).

Die Daten zeigen (Abb. 26), daß CRY2 die CLOCK-/BMAL1-induzierte *hPER1-luc*-Aktivierung konzentrationsabhängig inhibiert. CRY2 kann den stimulatorischen Effekt des Transaktivator-komplexes CLOCK/BMAL1 in Verdünnungen bis zu 1:30 signifikant hemmen. Die bisherigen Experimente zeigen die Effekte der Oszillatorgene. Im folgenden wurde die Signalweiterleitung der CLOCK-/BMAL1-vermittelten *hPER1-luc*-Induktion untersucht.

3.2.1.5 Hemmung der *hPER1-luc*-Aktivierung durch Inhibitoren

Die Charakterisierung der Signaltransduktionswege, die an der CLOCK/BMAL1-vermittelten *hPER1-luc*-Aktivierung beteiligt sind, wurde im Luciferase-Reportergen Test durchgeführt. Das verwendete *hPER1-luc*-Promotorkonstrukt wurde von Dirk Motzkus mittels bioinformatischer Analyse mit dem

Programm MatInspector charakterisiert. Als putative responsive Elemente des Promotors von *hPer1* wurden je drei Barbiturat-Box, CAAT-Box-Elemente, drei Bindungsstellen für C/EBP β und ein AP-1 Bindungsmotiv detektiert (MOTZKUS *et al.*, 2000), sowie drei weitere E-Box-Elemente.

Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurden HuH-7 Zellen mit verschiedenen Plasmidkonstrukten (A-FOS, A-C/EBP, PKI, A-CREB und K-CREB) kotransfiziert. Diese wurden im Hinblick auf die putativen responsiven Bindungselemente im Promotorbereich von *hPER1-luc* gewählt sowie aufgrund der Beobachtungen, daß *hPer1*-Genexpression durch PKA via CREB induziert werden kann (MOTZKUS *et al.*, 2000).

A-FOS ist eine dominant negative Form von C-FOS und inaktiviert die DNA-Bindung des FOS-JUN Heterodimers sowie die JUN-abhängige Transkriptionsaktivierung (OLIVE *et al.*, 1997). A-C/EBP, eine dominant negative Form des bZIP Proteins C/EBP, verdrängt C/EBP von der DNA und verhindert somit die Transkriptionsaktivierung (KTYLOV *et al.*, 1995).

Der Protein-Kinase A-Inhibitor (PKI) fungiert als kompetetiver Inhibitor der PKA, indem es mit dem eigentlichen Substrat um die Substratbindestelle in der Kinase konkurriert (DAY *et al.*, 1989).

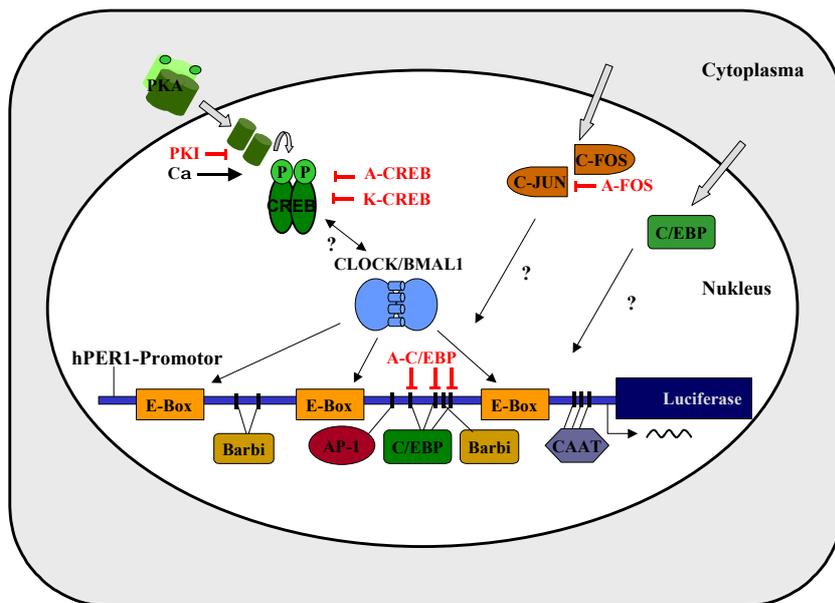


Abbildung 27

Schematische Darstellung der verwendeten peptidischen Inhibitoren auf die CLOCK/BMAL1- und PKA-vermittelte hPER1-luc-Aktivierung. Als putative responsive Elemente des hPer1-Promotors sind E-Box-Elemente, Barbi: Barbi-Box-Elemente, AP-1: Aktivator-Protein-1, C/EBP: CCAAT/Enhancer binding protein und CAAT-Elemente aufgeführt. Ca, Isoenzym der katalytischen Untereinheit der PKA führt zur Phosphorylierung von CREB. PKI inhibiert die PKA kompetitiv, A-CREB und K-CREB wirken als Inhibitoren von pCREB. A-C/EBP verhindert die Transkriptionsaktivierung, indem es C/EBP von der DNA verdrängt. A-FOS hemmt die Transkription durch Inaktivierung des FOS-JUN Heterodimers. Die mit Fragezeichen versehenen Pfeile kennzeichnen mögliche, noch nicht nachgewiesene Signalwege.

Zum Nachweis einer Beteiligung von pCREB an der CLOCK/BMAL1-vermittelten *hPER1-luc*-Aktivierung wurden Inhibitoren von pCREB verwendet, A-CREB und K-CREB. A-CREB bindet mit

hoher Affinität an pCREB, inhibiert die Phospho-CREB-Dimerisierung und somit die Bindung an das CRE-Element (AHN *et al.*, 1998). K-CREB hingegen ist ein CREB-Antagonist, der die Phosphorylierung kompetitiv inhibiert (WALTON *et al.*, 1992).

Abbildung 28 zeigt die Identifizierung neuer regulatorischer Signalproteine, die an der CLOCK/BMAL1-induzierten *hPER1*-luc-Aktivierung beteiligt sind. Aufgrund der vollständigen Inhibition der CLOCK/BMAL1-induzierten Promotoraktivierung wird vermutet, daß C-FOS bzw. in dimerisierter Form AP-1 ein wichtiges regulatorisches Element in der *hPer1*-Expression darstellt. Bisher gab es noch keinerlei Hinweise auf eine direkte Beteiligung von AP-1 an dem CLOCK/BMAL1-Transaktivierungssystem. Die Promotorregion von *hPER1*-luc hingegen weist ein putatives responsives AP-1-Element auf, das nur wenige Basen hinter der mittleren E-Box lokalisiert ist.

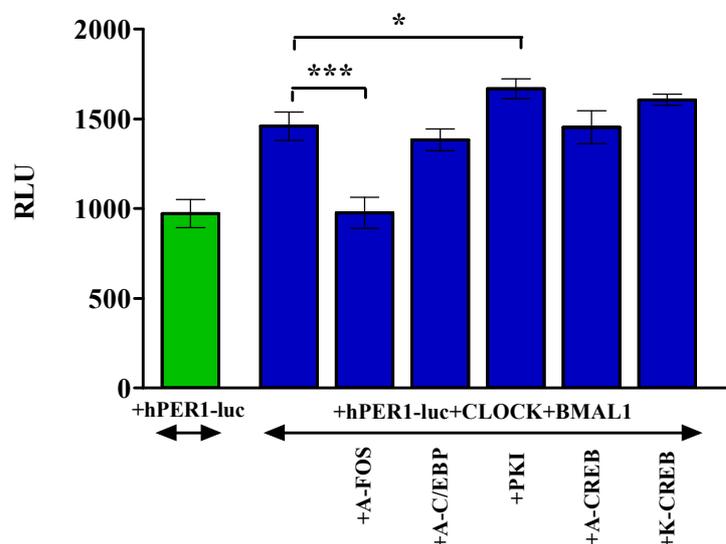


Abbildung 28

Wirkung von A-FOS, A-C/EBP, PKI, A-CREB und K-CREB auf die CLOCK/BMAL1-vermittelte *hPER1*-luc-Aktivierung. HuH-7 Zellen wurden mit dem Reporter-Plasmid *hPER1*-luc (grün) und Plasmiden, die für CLOCK, BMAL1, A-FOS, A-C/EBP, PKI, A-CREB und KCREB kodieren kotransfiziert (blau). Die jeweilig gewählten Kombinationen sind unter dem Balkendiagramm aufgeführt. Die Klammern verbinden verglichene Werte.

Kotransfektion mit A-C/EBP führt zu einer geringen Reduktion der Luciferaseaktivität. Im Promotorbereich wurden drei putative C/EBP β -responsive Elemente detektiert, die sich sehr eng beieinander hinter dem AP-1-Element befinden. Es wäre möglich, daß C/EBP regulierend auf die CLOCK/BMAL1-vermittelte *hPer1*-Aktivierung einwirkt.

Die Kotransfektionen mit PKI, A-CREB oder K-CREB führen zu keinem signifikant inhibitorischen Effekt auf die *hPER1*-luc-Aktivierung. Eine Beteiligung der PKA sowie von pCREB an der CLOCK/BMAL1-vermittelten Promotoraktivierung konnte somit nicht nachgewiesen werden.

Zusammengefaßt konnten für die CLOCK/BMAL1-vermittelte *hPER1*-luc-Induktion erste Hinweise auf weitere, bisher nicht detektierte Signalproteine (AP-1, C/EBP) im Oszillatorsystem von Leberzellen aufgezeigt werden. Die CLOCK/BMAL1-induzierte Promotoraktivierung verläuft hierbei unabhängig von der PKA.

3.2.2 Molekulare Regulationsmechanismen der CLOCK/BMAL1-unabhängigen *hPER1*-luc-Aktivierung via PKA und PKC

In den bisherigen Experimenten wurde die CLOCK/BMAL1-induzierte *hPER1*-luc-Aktivierung analysiert. Wie schon einführend erwähnt, zeigten MOTZKUS *et al.* (2000) daß *hPer1* durch zwei voneinander unabhängige Signalwege (PKA/CREB, PKC) induziert werden kann. TRAVNICKOVA-BENDOVA *et al.* (2002) zeigte ähnliche Ergebnisse für das *Period1*-Gen der Maus (*mPER1*), das unabhängig voneinander über CREB und CLOCK/BMAL1 induzierbar war. Für die zirkadiane Oszillation im SCN ist eine Beteiligung von CREB ("cAMP response element binding protein"), sowie der MAPK ("mitogen activated protein kinase") und der PKA an der CRE ("cAMP response element")-medierten Genexpression bereits 1999 von OBRIETAN *et al.* beschrieben. In der Epiphyse des Huhns wurde festgestellt, daß MAPK in dem zirkadianen System involviert ist (SANADA *et al.*, 2000). Um einen Vergleich der molekularen Regulationsmechanismen der *hPER1*-luc-Aktivierung und den daran beteiligten Signalproteinen zu erhalten, wurde nach CLOCK/BMAL1-vermittelter Promotoraktivierung die PKA- und PKC-medierte Induktion untersucht.

3.2.2.1 Aktivierung von *hPER1*-luc durch PKA- und PKC-aktivierende Substanzen und Ca, einem Isoenzym der katalytischen Untereinheit der PKA

Es wurde eine Analyse der *hPer1*-Induktion via PKA respektive PKC durchgeführt. Hierzu wurden HuH-7 Zellen mit *hPER1*-luc transient transfiziert und anschließend mit PKC- und PKA-stimulierenden Agentien allein und in Kombination für 6 h inkubiert. Zudem wurde ein Expressionsplasmid verwendet, das für C α kodiert, einem Isoenzym der katalytischen Untereinheit der PKA (HOWARD *et al.*, 1991).

Abbildung 29 zeigt die Aktivierung von *hPER1*-luc durch das PKC-stimulierende Agens PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat) sowie durch *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS und Forskolin. Dies läßt auf eine PKA- und PKC-vermittelte Aktivierung von *hPer1* schließen. Die beschriebene Potenzierung der Promotoraktivität (MOTZKUS *et al.*, 2000) nach Kostimulation mit *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS bzw. Forskolin und PMA konnte ebenfalls gezeigt werden. Als Erklärung hierfür werden zwei verschiedene transkriptionelle Mechanismen postuliert, die synergistisch zusammenwirken (MOTZKUS *et al.*, 2000). Die daran beteiligten Signalmoleküle wurden in einem weiteren Versuch charakterisiert.

Kotransfektion von *hPER1-luc* und $C\alpha$ führt zu einer signifikanten Zunahme der Luciferaseaktivität (Abb. 30). Die Aktivierung des Promotorkonstrukts ist demnach direkt durch PKA induzierbar.

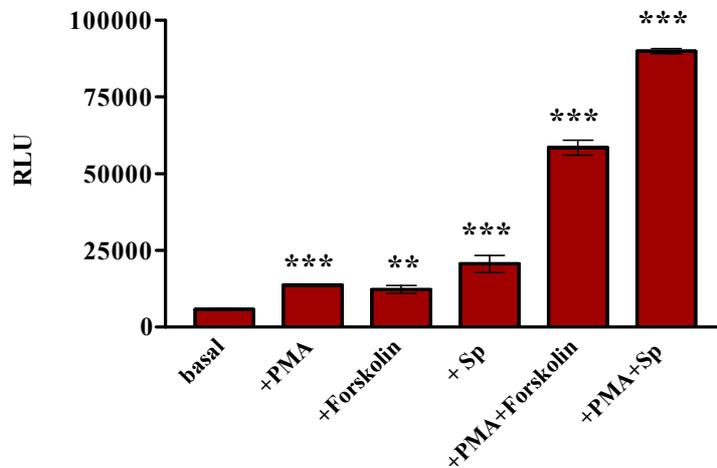


Abbildung 29

Synergistische Aktivierung des hPER1-Luciferase-Promotorkonstrukts durch PKA- und PKC-aktivierende Substanzen. HuH-7 Zellen wurden mit hPER1-luc transient transfiziert und anschließend für 6 h mit PMA [300 nM], Forskolin [5 μ M], Sp-5,6-DCI-cBiMPS [3 μ M] (abgekürzt Sp) sowie in Kombination PMA+Forskolin [300 nM/5 μ M] und PMA+Sp-5,6-DCI-cBiMPS [300 nM/3 μ M] stimuliert. Die Signifikanzen beziehen sich auf die Basalaktivität von hPER1-luc.

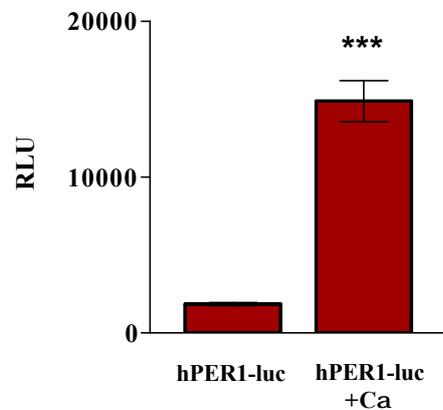


Abbildung 30

Aktivierung des hPER1-Luciferase-Promotorkonstrukts durch Ca, Isoenzym der katalytischen Untereinheit der PKA. HuH-7 Zellen wurden transient mit hPER1-luc sowie mit hPER1-luc und Ca transfiziert. Die Signifikanz bezieht sich auf die Basalaktivität des Promotorkonstrukts hPER1-luc.

3.2.2.2 Identifizierung beteiligter Signalproteine an der hPER1-luc-Aktivierung durch PMA und Forskolin

Bisher konnte gezeigt werden, daß PKA- und PKC-aktivierende Substanzen sowie $C\alpha$ -Transfektion unabhängig von CLOCK und BMAL1, zu einer Promotoraktivierung führen (3.2.2.1). Die beteiligten Signalmoleküle an der PKA- und PKC-medierte Signalweiterleitung wurden nachfolgend im

Reportergen Test charakterisiert. Hierzu wurden HuH-7 Zellen mit verschiedenen Plasmidkonstrukten (A-FOS, A-C/EBP, PKI, A-CREB und K-CREB) kotransfiziert (Abbildung 32) und anschließend für 6 h mit PMA und Forskolin stimuliert. Als Kontrolle dienten mit *hPER1-luc* transfizierte Zellen nach Kostimulation mit PMA und Forskolin. Die gemessene Luciferaseaktivität wurde normalisiert, indem die Basalaktivität unstimulierter Zellen auf 0% und der Maximalwert nach Stimulation mit PMA und Forskolin auf 100% gesetzt wurde.

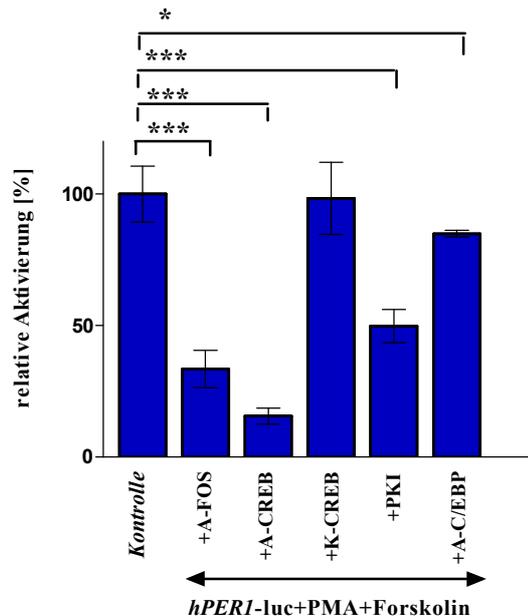


Abbildung 31

Wirkung verschiedener Inhibitoren auf die *hPER1-luc*-Aktivierung durch PKA- und PKC-aktivierende Substanzen. HuH-7 Zellen wurden mit dem Reporter-Plasmid *hPER1-luc* und den Plasmiden, die für A-FOS, AC/EBP, PKI, A-CREB, K-CREB und A-C/EBP kodieren, transient transfiziert. Anschließend wurde 6 h mit PMA [300 nM], Forskolin [5 μ M] sowie PMA+Forskolin [300 nM/5 μ M] stimuliert. Die Klammern verbinden miteinander verglichene Werte. Die Signifikanzen beziehen sich auf den 100%-Wert (Kontrolle) von *hPER1-luc* transfizierten Zellen nach Stimulation mit PMA+Forskolin.

Abbildung 31 zeigt, daß A-FOS zu einer signifikanten Reduktion der PMA/Forskolin-vermittelten *hPER1-luc* Aktivierung führt. Eine Beteiligung von AP-1 in der PKA und/oder PKC-medierten *hPer1*-Genexpression ist möglich. SHAULIAN und KARIN (2002) beschrieben, daß aktivierte MAPK über Phosphorylierung zur Dimerbildung von AP-1 führen kann (SHAULIAN & KARIN 2002). Die Aktivierung der MAPK ihrerseits kann durch PKA oder PKC induziert werden (GARRINGTON & JOHNSON 1999). Für HuH-7 Zellen wurde gezeigt, daß es bei der PKC-induzierten *hPER1-luc*-Aktivierung zur Phosphorylierung der MAPKp42/44 kommt, nicht jedoch bei PKA-vermittelter Expression (MOTZKUS *et al.*, 2000).

Kotransfektion mit A-CREB resultiert in einer signifikanten Inhibition der PMA/Forskolin-induzierten Promotoraktivierung. Eine Beteiligung von pCREB an der synergistischen *hPer1*-Induktion durch PKA und/oder PKC ist anzunehmen. MOTZKUS *et al.* (2000) konnten zeigen, daß die

Phosphorylierung von CREB primär durch PKA induziert wird, nicht jedoch durch PKC (MOTZKUS *et al.*, 2000). PKI konnte erwartungsgemäß die durch PMA und Forskolin induzierte *hPER1*-luc-Aktivierung signifikant inhibieren und bestärkt die Annahme einer Beteiligung der PKA in der *hPer1*-Induktion. Eine signifikante Hemmung der PMA- und Forskolin-vermittelten *hPER1*-luc-Aktivierung durch Kotransfektion mit A-C/EBP konnte detektiert werden, ein Hinweis auf eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors C/EBP an der PKA- und/oder PKC-induzierten Promotoraktivierung. Dies wird bestärkt durch bereits bestehende Daten von TRAUTWEIN *et al.* (1993), die eine Induktion von C/EBP β durch PKC über den Ras/MAPK-Signalweg zeigten.

Zusammenfassend konnten Hinweise auf eine Beteiligung von AP-1, C/EBP und CREB an der PKA/PKC-medierten *hPER1*-luc-Induktion ermittelt werden.

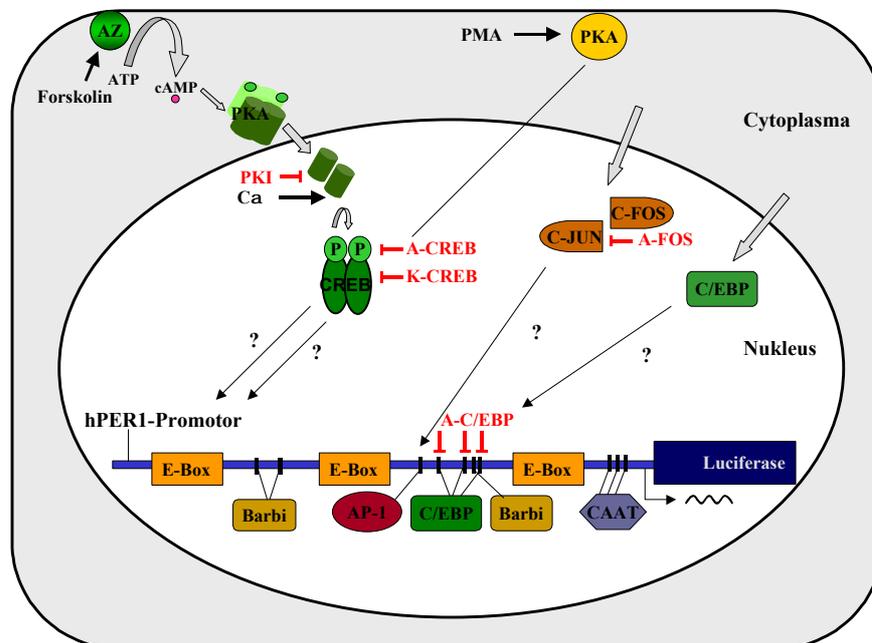


Abbildung 32

Schematische Darstellung der verwendeten peptidischen Inhibitoren auf die PKA- und PKC-vermittelte *hPER1*-luc-Aktivierung. Als putative responsive Elemente des *hPer1*-Promotors sind E-Box-Elemente, Barbi: Barbi-Box-Elemente, AP-1: Aktivator-Protein-1, C/EBP: CCAAT/Enhancer binding protein und CAAT-Elemente aufgeführt. Ca, Isoenzym der katalytischen Untereinheit der PKA führt zur Phosphorylierung von CREB. PKI inhibiert die PKA kompetitiv, A-CREB und K-CREB wirken als Inhibitoren von pCREB. A-C/EBP verhindert die Transkriptionsaktivierung, indem es C/EBP von der DNA verdrängt. A-FOS hemmt die Transkription durch Inaktivierung des FOS-JUN Heterodimers. Die mit Fragezeichen versehenen Pfeile kennzeichnen mögliche Signalwege.

3.2.2.3 Identifizierung beteiligter Signalproteine an der *hPER1*-luc-Aktivierung durch die katalytische Untereinheit Ca der PKA

Die bisherige Charakterisierung beteiligter Signalmoleküle an einer *hPer1*-Aktivierung durch die PKA und PKC wurde unter Verwendung PKA- und PKC-aktivierender Substanzen (PMA, Forskolin)

durchgeführt, deren Wirkungsort im Cytoplasma lokalisiert ist (3.2.2.2). Im folgenden wurde die Untersuchung beteiligter Mediatoren im PKA-Signalweg mit Ca im Reporter-gen Test durchgeführt. Ca ist ein Isoenzym der katalytischen Untereinheit der PKA und wirkt unter anderem im Nukleus der Zelle. Es wurde hierzu eine transiente Transfektion von HuH-7 Zellen mit *hPER1-luc* und Ca sowie mit verschiedenen Expressionsplasmiden durchgeführt. Diese kodierten für A-FOS, A-C/EBP, PKI, A-CREB sowie K-CREB und wurden in konstanten Plasmid-DNA Mengen eingesetzt. Es wurde eine Normalisierung der resultierenden Luciferaseaktivität durchgeführt. Die Basalaktivität transfizierter Zellen mit *hPER1-luc* entsprach 0% und die Aktivität nach Transfektion mit *hPER1-luc* und Ca 100%.

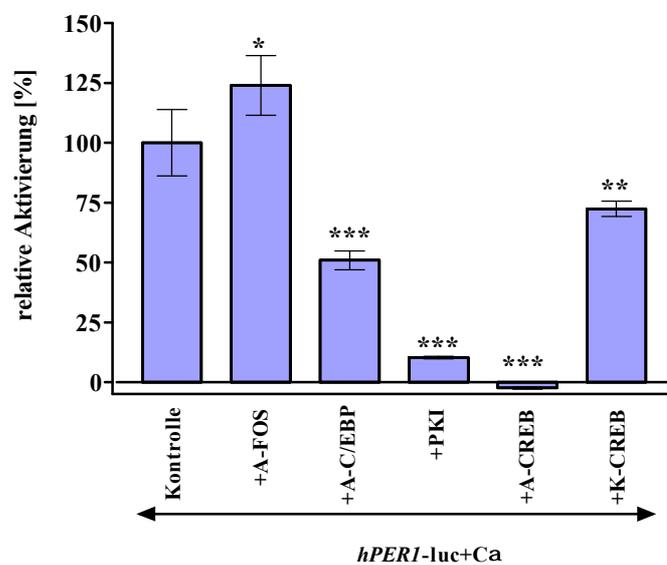


Abbildung 33

*Inhibition der Ca -vermittelten *hPER1-luc* Aktivierung. HuH-7 Zellen wurden mit dem Reporter-Plasmid *hPER1-luc* sowie mit verschiedenen Plasmiden, die für Ca , A-FOS, A-C/EBP, PKI, A-CREB und K-CREB kodieren, transfiziert. Die Signifikanzen beziehen sich auf den 100%-Wert nach Kotransfektion mit *hPER1-luc* und Ca (Kontrolle).*

Abbildung 33 zeigt eine signifikante Induktion der *hPER1-luc*-Aktivität durch Kotransfektion mit Ca und weist demnach auf eine PKA-vermittelte *hPer1*-Aktivierung hin. Die signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität durch Kotransfektion mit PKI bestätigt das Ergebnis.

Kotransfektion mit A-FOS ruft keinen inhibitorischen Effekt auf die *hPER1-luc*-Aktivität hervor, es ist hingegen ein leichter Anstieg der Luciferaseaktivität detektierbar (Abb. 33). Die Ergebnisse konnten nicht zeigen, daß AP-1 an der Aktivierung von *hPER1-luc* via PKA involviert ist. Der detektierte hemmende Effekt von A-FOS auf die PKA/PKC-vermittelte Promotorinduktion (3.2.2.2) führt zu der Annahme einer AP-1-Beteiligung in der PKC-vermittelten *hPer1*-Induktion.

Die Verwendung von A-C/EBP resultiert in einer signifikanten Reduktion der Luciferaseaktivität (Abb. 33), was demnach auf eine Beteiligung von C/EBP in der Signalweiterleitung von PKA

hinweist. Die stimmt mit den Ergebnissen einer Reduktion der PMA/Forskolin-medierten Promotorinduktion durch A-C/EBP überein und bestärkt die Annahme einer Beteiligung von C/EBP im PKA-Signalweg.

Kotransfektion mit A-CREB führt wie erwartet zu einer vollständigen Inhibition der C α -vermittelten Promotoraktivierung. K-CREB führt zu einer signifikanten, wenn auch geringeren Inhibition als A-CREB. Die Annahme einer Teilnahme von pCREB an der PKA-induzierten *hPer1*-Genexpression wurde somit bestätigt. Für die PKA-induzierte *hPER1*-luc-Aktivierung, ausgelöst durch C α , ist somit eine Beteiligung der Signalmoleküle pCREB und C/EBP zu vermuten. AP-1 hingegen scheint in der Promotoraktivierung via PKC involviert zu sein.

Zusammenfassend wurde der Signalweg der *hPER1*-luc-Aktivierung durch CLOCK/BMAL1-Heterodimere sowie über die CLOCK/BMAL1-unabhängige Signalkaskade der PKA und PKC charakterisiert. Für die CLOCK/BMAL1-vermittelte *hPER1*-luc-Induktion gibt es Hinweise auf eine Beteiligung der Signalmoleküle AP-1 und C/EBP. Für die CLOCK/BMAL1-unabhängige Promotoraktivierung via PKA ist eine Beteiligung von pCREB und C/EBP anzunehmen. Die CLOCK/BMAL1-unabhängige *hPER1*-luc-Induktion via PKC läßt des weiteren das Mitwirken von AP-1 vermuten.

4 Diskussion

4.1 Expression und Regulation des humanen CCL15-Gens

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression und Regulation des humanen CCL15-Gens untersucht. Das CC-Chemokin CCL15 weist chemotaktische Wirkung auf zahlreiche Immunzellen auf, die primär durch die Bindung an CCR1 mediiert wird (siehe 1.3.3), die genaue Funktion von CCL15 ist bisher noch unklar. Aufgrund der Vielzahl an Zielzellen sowie deren entsprechende Rezeptoren, wird eine inflammatorische Wirkung von CCL15 angenommen. Untersuchungen dieser Arbeit sollen Rückschlüsse auf putative Funktionen von CCL15 liefern. CCL15-Expression wurde bisher primär in der Leber detektiert (COULIN *et al.*, 1997, PARDIGOL *et al.*, 1998) und läßt eine Beteiligung von CCL15 an inflammatorischen Prozessen der Leber vermuten. CC-Chemokine führen primär zur Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten und sind somit speziell in chronischen Entzündungsprozessen von wesentlicher Bedeutung (LUSTER 1998). In chronischer Hepatitis C beispielsweise, wurden erhöhte Konzentrationen an IL-6 und IL-1 β in Patienten-Seren ermittelt (LAPINSKI 2001). Für Zytokine ist bekannt, daß sie die Bildung und Regulation von Chemokinen steuern. Es resultiert die Vermutung, daß CCL15 in chronischen Lebererkrankungen durch Zytokine wie beispielsweise IL-1 β und IL-6 reguliert werden könnte.

4.1.1 Analyse der endogenen CCL15-Genexpression

Die endogene CCL15-Expression wurde in der vorliegenden Arbeit mittels *TaqMan*-Experimenten analysiert, Untersuchungen der Transkriptions-Aktivierung wurden im Luciferase-Reporter-Gen-Test durchgeführt. *TaqMan*-Analysen von 15 humanen Geweben zeigen, daß CCL15 im Gegensatz zu den bestehenden Daten weniger limitiert vorkommt und in einer Vielzahl verschiedener Gewebe exprimiert wird (siehe 3.1.1.1). Die höchste Anzahl an Transkripten wurde hierbei in der Leber detektiert und bestärkt die Vermutung einer CCL15-Beteiligung in inflammatorischen Prozessen der Leber.

Es ist festzustellen, daß es sich bei den Geweben stärkerer Expression (Leber, Luftröhre, Niere, Kolon, Lunge) mit Ausnahme der Luftröhre, um gut durchblutete Organe mit hoher Stoffwechselaktivität handelt. Zudem ist auffallend, daß alle Organe einem direkten und permanenten Kontakt mit Pathogenen ausgesetzt sind und für den Organismus eine zentrale Rolle in der Elimination von Fremdstoffen einnehmen. Luftröhre und Lunge kommen durch die Atemluft mit Pathogenen in Kontakt, der Magen durch die aufgenommene Nahrung. Die Niere ist für die Elimination von Endprodukten des Stoffwechsels und Fremdstoffen zuständig, die Leber ist für die Entgiftung und Entsorgung von Stoffwechselendprodukten verantwortlich. Alle diese Organe sind bei der Elimination

von Fremdstoffen und eindringenden Erregern auf die Anwesenheit phagozytierender Immunzellen angewiesen. Die Rekrutierung dieser Leukozyten wird durch die chemotaktische Wirkung von Chemokinen gewährleistet, die durch bestimmte Stimuli (proinflammatorische Zytokine, LPS, etc.) induzierbar sind.

Die hohe Expression von CCL15 in der Leber sowie in geringerem Maß in Luftröhre, Niere, Kolon und Lunge wäre durch die vermutete Funktion der Elimination von Fremdstoffen erklärbar. Eine vermehrte Anwesenheit von Fremdbestandteilen und Pathogenen würde zur Aktivierung des CC-Chemokins CCL15 führen, und damit in der Rekrutierung von Leukozyten und Elimination der Fremdstoffe resultieren. Dieser Erklärungsansatz würde CCL15 eine bedeutende Rolle im Schutzmechanismus des Organismus gegen auftretende Pathogene zukommen lassen, und die Annahme eines klassischen inflammatorischen Chemokins bestärken. Der genaue Wirkmechanismus kann jedoch von Zelltyp zu Zelltyp variieren und ist zudem von dem jeweilig herrschenden Zytokinmilieu abhängig (MANTOVANI & SOZZANI 2000).

Des Weiteren ist auffällig, daß die Gewebe mit stärkerer Genexpression in den Bereichen der Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) liegen, in denen es zur Differenzierung und Proliferation reifer T- und B-Zellen kommt. Eine Beteiligung von CCL15 an der Differenzierung der T- und B-Zellen und somit die Funktion eines "homing" Chemokins (BAGGIOLONI 2000) scheint relativ unwahrscheinlich. Grund hierfür ist CCR1, der wesentliche Rezeptor von CCL15, der als klassischer inflammatorischer Chemokin-Rezeptor beschrieben ist (MACKAY 2001). Ein weiteres typisches Merkmal von inflammatorischen Chemokinen ist ihre Induzierbarkeit durch inflammatorische Stimuli. Dieses wurde für CCL15 in einem anschließenden Experiment getestet, das Aufschluß über die Funktion des CC-Chemokins geben sollte.

4.1.2 Analyse der induzierten CCL15-Genexpression

Zytokine sind an der Aktivierung und Regulation von Chemokinen involviert; das jeweilige Zytokinmilieu steuert die Ausbildung der Chemokin-Rezeptoren. Für die Identifizierung CCL15-aktivierender Substanzen wurden zwölf verschiedene Zytokine in der humanen Hepatoma Zelllinie HuH-7 im Luciferase-Reportergen Test untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Promotoraktivierung durch die Interleukine IL-1 β und IL-6 sowie durch die Interferone IFN- α und IFN- γ (siehe 3.1.1.3). Hierbei sind IL-1 β und IL-6 klassische proinflammatorische Zytokine, wohingegen Interferonen primär antivirale, antiproliferative sowie immunmodulatorische Wirkungen zugesprochen werden. Diese induzierbare Promotoraktivierung von CCL15 spricht eindeutig für die Funktion eines inflammatorischen Chemokins und bestärkt die Annahme, daß CCL15 in Entzündungsreaktionen der Leber durch IL-1 β und IL-6 induzierbar ist.

4.1.3 Putative Funktionen von CCL15 in Entzündungsprozessen der Leber

Die Leber ist durch ihren heterogenen zellulären Aufbau gekennzeichnet (siehe 1.4). Hepatozyten und nicht-parenchymale Zellen sind zur Synthese verschiedener Zytokine und Chemokine befähigt, die systemisch in anderen Organen des Körpers wirken oder parakrin Hepatozyten und andere nicht-parenchymalen Zellen beeinflussen können (RAMADORI & ARMBRUST 2001). Die detektierten Interleukine IL-1 β und IL-6 führen in der Leber zur Aktivierung von Kupffer Zellen, Sternzellen und Hepatozyten, wobei die ersten beiden nach Aktivierung auch zur Chemokin-Synthese befähigt sind.

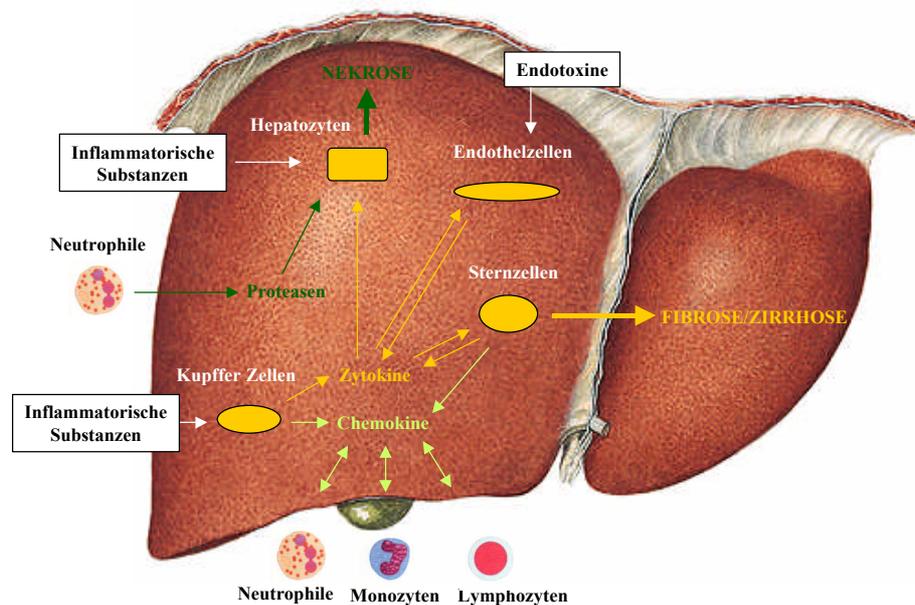


Abbildung 34

Schematische Darstellung der Interaktionen im Entzündungsgeschehen der Leber sowie der beteiligten hepatischen Zellpopulationen und Leukozyten. Aktivierte Kupffer Zellen können Zytokine synthetisieren, die wiederum Hepatozyten, Endothel- und Sternzellen beeinflussen können. Die sezernierten Chemokine führen zur Rekrutierung primär von Neutrophilen, die durch den Phagozytosevorgang Proteasen ausscheiden, die zur Schädigung (Nekrose) der Hepatozyten führen. Endothelzellen sind durch Zytokine sowie Endotoxine aktivierbar und können ihrerseits Zytokine bilden. Aktivierte Sternzellen sind außer der Zytokin-Produktion zur Synthese von Chemokinen befähigt und können so wiederum regulierend in den komplexen Entzündungsprozess einwirken.

In akuten Entzündungsprozessen der Leber würden IL-1 β und IL-6, die zwei wesentliche Zytokine der akuten Entzündung darstellen, zur Aktivierung von Kupffer Zellen führen. Diese sezernieren Chemokine, die primär eine chemotaktische Rekrutierung von Neutrophilen und nur in geringerem Maß von Monozyten vermitteln. Die chemotaktische Wirkung von CCL15 auf Monozyten und Lymphozyten wurde von verschiedenen Forschungsgruppen nachgewiesen. Die Rekrutierung von Neutrophilen konnte erst einmalig von YOUNG *et al.* (1997) gezeigt werden. Generell jedoch wird die Infiltration von Neutrophilen von CXC-Chemokinen vermittelt und nicht von CC-Chemokinen (LUSTER 1998, MANTOVANI 1999). Zudem ist für die Rezeptoren CCR1 und CCR3, an die CCL15

bindet, bisher keine Expression auf Neutrophilen bekannt (LUSTER 1998). Aufgrund dieser nicht eindeutigen Daten bezüglich einer CCL15-vermittelten Rekrutierung von Neutrophilen via CCR1 oder CCR3 würde sich die Beteiligung von CCL15 in akuter Inflammation auf die chemotaktische Migration von Monozyten beschränken. Eine Beteiligung von CCL15 an akuten Entzündungsprozessen der Leber ist demnach eine geringere Bedeutung zuzuschreiben.

Die chemotaktische Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten ist außerdem ein wesentlicher Bestandteil chronischer Entzündungsprozesse wie zum Beispiel chronischer Hepatitis nach Alkoholmißbrauch, viraler HBV- oder HCV-Infektion. In chronischen Leberentzündungen sind Sternzellen die wesentlichen Produzenten von Chemokinen und Zytokinen. Eine Aktivierung der Sternzellen durch IL-1 und IL-6 ist beschrieben, so daß eine Synthese von CCL15 durch Interleukin-aktivierte Sternzellen vorstellbar ist. In diesem Kontext würde CCL15 zur Rekrutierung primär von Monozyten und Lymphozyten führen. Es ist bekannt, daß aktivierte Leukozyten ihrerseits durch weitere Zytokin-Produktion eine erneute Aktivierung der Sternzellen auslösen können. Es wäre denkbar, daß CCL15 über einen solchen Rückkopplungsmechanismus zur Progression einer Fibrose und letztendlich zur Bildung einer Zirrhose beitragen könnte. Auch eine Beteiligung an der Karzinombildung und Metastasierung ist für Chemokine in unterschiedlichster Weise bekannt und demnach für CCL15 nicht auszuschließen. Es ist zu beachten, daß die Untersuchungen in einer humanen Hepatoma Zelllinie (HuH-7) stattfanden, die 1982 von NAKABAYASHI *et al.* beschrieben wurde. Die Verwendung von Zelllinien gewährleistet einerseits ein standardisiertes Arbeiten unter konstanten Bedingungen. Die erhaltenen Ergebnisse können jedoch von der *in vivo* Situation abweichen und müssen in anschließenden Tests abgeglichen werden.

4.1.4 *Klinische Relevanz des humanen CC-Chemokins CCL15*

Chemokine sind durch ihre bedeutende Rolle in der Regulation von Immun- und Inflammationsreaktionen von immer größerem klinischen Interesse geworden. Es wird gehofft, durch die Neutralisation der Chemokin-Aktivität einen therapeutischen Effekt erzielen zu können. LUSTER diskutiert bereits 1998 die Möglichkeit durch Chemokin- oder Chemokin-Rezeptor-Antagonisten septische Prozesse, Allergien oder Autoimmunkrankheiten hemmen zu können. Es ist demnach wichtig, detaillierte Kenntnisse über die Wirkungsmechanismen der Chemokine wie zum Beispiel CCL15 zu erhalten.

Die putativen Funktionen von CCL15 müßten in weiteren Versuchen experimentell ermittelt werden. Ziel wäre als erstes eine Analyse der Leberzellpopulationen, die CCL15 nach Induktion synthetisieren, eine Analyse der Zielzellen sowie Untersuchungen, über welche Rezeptoren diese Bindung zustande kommt. Das Arbeiten mit primären Zellen und eine mögliche Kultivierung der einzelnen Zellpopulationen könnten hierbei von Nutzen sein. Ein nächster Schritt wäre die genaue Analyse betreffend der

Funktion und Wirkung von CCL15. Eine Blockade oder Neutralisation von CCL15 wäre für funktionelle Untersuchungen denkbar, oder auch die Verwendung möglicher Knock-out-Modelle der murinen Orthologe CCL6 sowie CCL9 und 10. In den jeweiligen Experimenten wäre eine Reduktion der Fibrose-Bildung in hepatischem Gewebe zu erwarten. CCL15 könnte in diesem Fall von enormen therapeutischen Nutzen in chronischer Hepatitis sein. Allerdings ist zu beachten, daß nur wenige Chemokine allein eine spezifische Reaktion erzielen; gerade inflammatorische Chemokine wirken im Kontext mit anderen Mediatoren zusammen und sind wesentlich von dem bestehenden Zytokinmilieu abhängig. Die experimentellen Untersuchungen des funktionellen Mechanismus sowie die klinische Relevanz von CCL15 gestalten sich demnach sehr komplex. Um ein besseres Verständnis über die Abläufe der CCL15-Induktion zu erhalten wurden in dieser Arbeit in einem weiteren Schritt die Signalwege von IL-1 β und IL-6 untersucht die zur CCL15-Aktivierung führen.

4.2 Charakterisierung der Signalwege in der Interleukin-vermittelten Aktivierung von CCL15

Daten der vorliegenden Arbeit weisen erstmalig auf eine induzierbare Expression des Chemokins CCL15 durch IL-1 β und IL-6 in der Leber hin. Zur näheren Charakterisierung von Regulationsmechanismen der CCL15-Expression, wurde die IL-1 β - und IL-6-induzierte Promotoraktivierung im Luciferase-Reportergen Test untersucht.

4.2.1 Initiierung der Signalweiterleitung über die spezifischen Zytokin-Rezeptoren IL-1RI und IL-6R

Die ersten Untersuchungen bezogen sich auf den Nachweis der spezifischen Liganden-Rezeptorbindung von IL-1 β und IL-6 in der humanen Hepatoma Zelllinie HuH-7. Prinzipiell bestehen Zytokin-Rezeptoren aus einer spezifischen Liganden-bindenden Untereinheit und einer signalübertragenden Polypeptidkette (siehe 1.2.2).

Die spezifische Bindung des Zytokins IL-6 an gp80 konnte im Luciferase-Reportergen Test unter der Verwendung des Rezeptor-blockierenden Antikörpers rhIL-6 sR gezeigt werden. Inkubation mit rhIL-6 sR hemmte die Promotoraktivität. Des weiteren konnte die beschriebene Spezifität von IL-1RI durch die Inkubation IL-1-stimulierter Zellen mit dem inhibierenden Rezeptor-Antikörper rhIL-1 sRI bestätigt werden. Die in dieser Arbeit untersuchte Zytokin-induzierte Promotoraktivierung von pCC-2-luc wird demnach über zwei voneinander unabhängige Rezeptor-Komplexe durch eine spezifische Liganden-Rezeptorbindung vermittelt.

4.2.2 Interleukin-1 β - und Interleukin-6-induzierte intrazelluläre Signalweiterleitung

Nachdem der Nachweis einer spezifischen Bindung von IL-1 β und IL-6 an die Liganden-bindende Untereinheit erbracht war, wurde in weiteren Versuchen die intrazelluläre Signalweiterleitung untersucht. Diese wird über die signalweiterleitende Untereinheit der Zytokin-Rezeptoren vermittelt, die bei IL-1 β dem IL-RAcP entspricht und bei IL-6 der Polypeptidkette gp130. Eine intrinsische Protein Tyrosinkinase-Aktivität in der cytoplasmatischen Region konnte bisher nicht nachgewiesen werden, so daß die Tyrosinkinase-Aktivität durch intrazelluläre Tyrosinkinasen vermittelt wird, die Rezeptor-assoziiert vorliegen oder cytoplasmatisch lokalisiert sind (TANIGUCHI 1995).

Für die IL-6-vermittelte Signalweiterleitung sind in der Literatur zwei Hauptwege beschrieben. Es handelt sich um den JAK/STAT-Signalweg (GERHARTZ *et al.*, 1996, HEINRICH *et al.*, 1998) sowie um Ras/Mitogen-aktivierte Proteinkinase-(MAPK) Signalkaskaden (KUMAR *et al.*, 1994, FUKADA *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu dem Signalweg von Interleukin-6 gestaltet sich der IL-1 β -Signalweg wesentlich komplexer und ist noch zu einem Großteil unklar. Ähnlich zu der Beobachtung, daß IL-1R keine Sequenzhomologien zu anderen Zytokin-Rezeptoren aufweist, zeigen sich auch keine Gemeinsamkeiten zu bisher bekannten Mechanismen in der Signalweiterleitung (MARTIN & FALK 1997).

4.2.2.1 IL-6-induzierte Promotoraktivierung über den JAK/STAT-Signalweg

Zur Untersuchung einer putativen Beteiligung des JAK/STAT-Signalwegs an einer IL-6-induzierten CCL15-Expression, wurde der spezifische Inhibitor Tyrphostin AG 490 (AL-SHAMI *et al.*, 1999, DE VOS *et al.*, 2000) eingesetzt. Dieser hemmt aktivierte JAK2, verhindert die Phosphorylierung der STAT-Proteine, was zur Unterbrechung des JAK/STAT-Signalwegs führt und somit zu einer reduzierten Luciferaseaktivität. Im Luciferase-Reportergen Test konnte unter Verwendung von Tyrphostin AG 490 die Beteiligung von JAK2 an der IL-6-vermittelten Induktion des Promotorkonstrukts pCC-2-luc nachgewiesen werden. Die durch IL-6-induzierte JAK2-Aktivierung resultiert primär in einer Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 (FUJITANI *et al.*, 1994, ZHONG *et al.*, 1994). In einer bioinformatischen Analyse der potentiellen Promotorregion von CCL15 wurde von FORSSMANN *et al.* (2001) ein STAT-Bindungselement detektiert, was durch eine weitere Analyse in dieser Arbeit (siehe 3.1.2.3.2) bestätigt wurde. Es ist anzunehmen, daß die untersuchte IL-6-Signalkaskade über JAK2 den JAK/STAT-Signalweg initiiert und sich die STAT-Dimere an das ermittelte STAT-Bindungsmotiv anlagern und somit zur Promotoraktivierung von CCL15 führen könnten. Der JAK/STAT-Signalweg zeichnet sich dadurch aus, daß ein Signal in Form einer Tyrosin-Phosphorylierung unmittelbar an die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren gekoppelt ist. Durch diesen kurzen Signalweg und die geringe Anzahl der beteiligten Komponenten wird eine schnelle und direkte Signalweiterleitung von hoher Spezifität ermöglicht. Die Beteiligung von IL-6 in Entzün-

dungsreaktionen, gerade in akuten Phasen, ist auf eine schnelle und sichere Signalweiterleitung angewiesen. Eine effiziente Zell-Zell-Kommunikation muß gewährleistet sein, um einen Infektionsschutz des Organismus zu sichern. Hierzu zählt auch die Aktivierung von Chemokinen, wie CCL15, die für die Rekrutierung der Leukozyten verantwortlich sind. Dieser Weg wäre gerade in einer effektiven Eliminierung von pathogenen Substanzen von großer Bedeutung, die in Gewebe höherer CCL15-Expression vermutet wird.

4.2.2.2 *IL-6-induzierte Promotoraktivierung über den Ras/MAPK-Signalweg*

Eine weitere wesentliche Komponente in der IL-6-Signalweiterleitung stellt die Familie der MAP-Kinasen dar (siehe 1.1.3.1). Eine Beteiligung der drei MAP-Kinase-Signalkaskaden in der IL-6-Signalweiterleitung ist beschrieben (BOULTON *et al.*, 1994, FUKADA *et al.*, 1996, XU *et al.*, 1998, ZAUBERMAN *et al.*, 1999). Daten der vorliegenden Arbeit weisen auf eine MAPK-Beteiligung in der IL-6-vermittelten CCL15-Genexpression hin. Hierbei konnte die Induktion der MAPK nach IL-6-Inkubation mittels Western-Blot Analysen nachgewiesen werden. Im Luciferase-Reportergen Test war eine Beteiligung von MAPK durch die Verwendung des pharmakologischen Inhibitors PD 98059 (MEK1) nicht zu detektieren (Kapitel 3.1.2.2).

Die Gruppe der Ras/MAPK-Signalwege sind im Vergleich zu dem JAK/STAT-Weg komplexer und vielfältiger aufgebaut. Die sequentiell hintereinander geschalteten Proteinkinasen ermöglichen ein flexibles Prinzip, das zur Amplifikation und Regulation der Signale fähig ist. Regulatorische Mechanismen sind in Entzündungsreaktionen von wesentlicher Bedeutung, da sich das Immunsystem auf die jeweiligen Bedingungen einstellen und auf Änderungen effektiv reagieren muß. Neben einer direkten und unmittelbaren Transkriptionsaktivierung durch den JAK/STAT-Weg wäre durch die Beteiligung des Ras/MAPK-Weg eine variable Signalregulation ermöglicht. Die Aktivierung von CCL15 könnte somit effektiv an die jeweils herrschenden Bedingungen angepaßt werden. In akuten Entzündungsprozessen als auch im Verlauf chronischer Inflammation wäre somit optimaler Schutz des Organismus vor pathogenen Substanzen gewährleistet. Die Kaskade der Ras/MAPK führt letztendlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die für die Transkriptionsregulation verantwortlich sind. Ras/MAPK-responsive Transkriptionsfaktoren sind vielfältig (siehe 1.1.3.1). NAKAJIMA *et al.* konnten bereits 1993 die IL-6-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors C/EBP β via Ras/MAPK nachweisen. Promotoranalysen des verwendeten Promotorkonstrukts pCC-2-luc wiesen ein C/EBP β -Bindungsmotiv auf (siehe 3.1.3.4). Zusammenfassend mit den Ergebnissen der Western-Blot Analyse, in denen eine Induktion der MAPK nachgewiesen werden konnte, kann vermutet werden, daß der IL-6-induzierte Ras/MAPK-Signalweg in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors C/EBP β resultiert und somit zur CCL15-Aktivierung beiträgt. C/EBP β gehört zur Familie der "basic leucin zipper" (bZIP)-Proteine (HURST 1995) und ist an zellulärer Proliferation und Differenzierung sowie an

Immun- und Inflammationsprozessen beteiligt. Die konstitutive Expression von C/EBP β wurde im besonderen in Leber, Darm, Lunge, adipösem Gewebe, Milz, Niere und myelomonozytischen Zellen beschrieben (RAMJI & FOKA 2002). Quantitative Transkript-Analysen dieser Arbeit zeigen hohe Expression in der Leber, sowie mäßige Expression in Niere, Lunge und Darm und sind mit einem Großteil der C/EBP β -exprimierenden Gewebe deckungsgleich. Diese Beobachtungen bestärken die Annahme einer Beteiligung von C/EBP β an der Promotoraktivierung von CCL15; C/EBP β könnte hierbei über die IL-6-aktivierte MAPK induziert werden.

Voraussetzung für die Bindung an DNA-Sequenzmotive ist die Dimerisierung der C/EBP-Proteine. Die Dimerisierung ihrerseits ermöglicht eine präzise Regulation der Transkriptions-Aktivierung von Zielgenen. Mitglieder der C/EBP Familie können untereinander und mit anderen, nicht-bZIP-Proteinen Heterodimere bilden (RAMJI & FOKA 2002). Bioinformatische Analysen der potentiellen CCL15-Promotorregion ermittelten außer C/EBP β weitere Bindungsmotive für "Transcription activator protein-1" (AP-1) und "Nuclear factor κ B" (NF κ B). Für Untereinheiten von NF κ B (β -Faltblatt-Struktur), AP-1 (bZIP-Struktur) sowie für CREB/ATF (bZIP-Struktur) ist eine Heterodimerisierung mit C/EBP β beschrieben (LECLAIR *et al.*, 1992, VALLEJO *et al.*, 1993, HSU *et al.*, 1994, RAMJI & FOKA 2002). Während der IL-6-induzierten CCL15-Expression ist theoretisch die Bildung verschiedener C/EBP β -Heterodimere via Ras/MAPK möglich, die in der Induktion der CCL15-Promotoraktivierung resultieren. Nachdem eine Beteiligung der MAPK nachgewiesen wurde und putative Promotorelemente (C/EBP β , AP-1, NF κ B) identifiziert wurden, ist die genauere Charakterisierung von der Signalweiterleitung stromabwärts der MAPK sowie eine eindeutige Identifizierung von C/EBP β -Homodimeren oder entsprechenden Heterodimeren von großem Interesse. Es könnten Rückschlüsse über die Regulation von CCL15 gezogen werden, und eventuelle Unterschiede der Signalweiterleitung akuter und chronischer Entzündungsprozesse aufgezeigt werden.

4.2.2.3 Funktion der Proteinkinase A (PKA) in der IL-6-induzierte Promotoraktivierung

Weitere Untersuchungen mittels Luciferase-Reportergen Test zeigten eine Aktivierung des pCC-2-luc-Promotorkonstrukts durch das PKA-spezifische, zellpermeable cAMP-Analog *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS (SANDBERG *et al.*, 1991, SCHWEDE *et al.*, 2000) sowie durch das Diterpen Forskolin (SOUZA *et al.*, 1983). Kostimulation mit IL-6 resultierte in einer additiven Erhöhung der Promotoraktivität (siehe 3.1.2.3.2). Die Inkubation mit dem pharmakologischen PKA-Inhibitor *Rp*-8-CPT-cAMPS (GJERTSEN *et al.*, 1995) führte zu einer Reduktion der PKA-medierten Promotoraktivität sowie interessanterweise auch zu einer reduzierten IL-6-induzierten Promotoraktivität. Dies ließ anfänglich auf eine direkte Beteiligung des PKA-Wegs in der IL-6-induzierten CCL15-Expression schließen. Transiente Transfektions-Experimente mit C α , einem Isoenzym der katalytischen Untereinheit der PKA (HOWARD *et al.*, 1991) und PKI, dem kompetitiven Inhibitor der PKA (DAY *et al.*, 1989) ergaben eine

Inhibition der $C\alpha$ -induzierten Promotoraktivität, zeigten jedoch keinen Einfluß auf die IL-6-vermittelte Aktivierung. Es scheint sich demnach um keine direkte Aktivierung des PKA-Signalwegs durch IL-6 zu handeln. Möglicherweise kommt es zu einer Interaktion zwischen dem PKA- und dem IL-6-Signalweg, die indirekt modulierende Wirkung auf die Genexpression ausübt. Generell resultiert eine PKA-Aktivierung in der Dissoziation in regulatorische und katalytische Untereinheiten, wovon letztere in den Kern diffundieren und zur Phosphorylierung und Dimerisierung des "CRE-binding proteins" (CREB) führen. Dimeres pCREB bindet an CRE-Elemente der Konsensussequenz TGACGTCA.

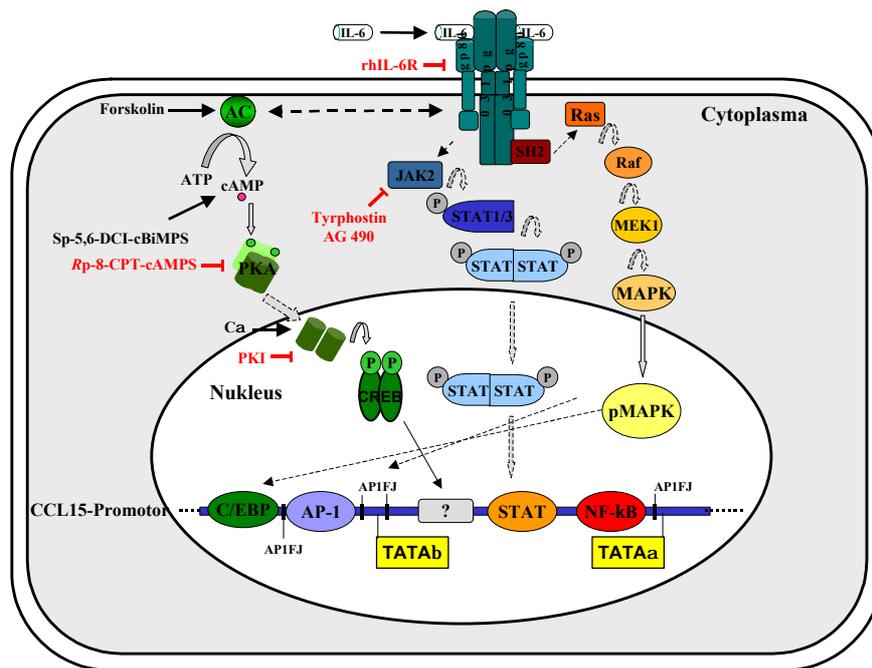


Abbildung 34

Schematische Darstellung putativer Signalwege in der IL-6- und PKA-vermittelten pCC-2-luc-Aktivierung. Es sind die aus Inhibitorerperimenten und Western-Blot Analysen ermittelten Signalmoleküle und die daraus resultierenden Signalwege (PKA, JAK/STAT, Ras/MAPK, p38) mit möglichen Verzweigungen aufgeführt. Zudem sind die putativen, für die Signalwege relevanten responsiven Elemente des CCL15-Promotors dargestellt. C/EBPb: CAAT/Enhancer binding protein b, AP-1: Activator-Protein-1, AP1FJ: Activator-Protein-1 Fos-Jun, NFAT: Nuclear factor of activated T cells, STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription, NF κ B: Nuclear Factor- κ B, TATAa: bekannte TATA-Box, TATAb: neu ermittelte TATA-Box. Die verwendeten Inhibitoren sind in rot aufgeführt und durch einen Balken gekennzeichnet. rhIL-6R wirkt als Rezeptor-blockierender Antikörper des IL-6R, Tyrophostin AG 490 hemmt JAK2, Rp-8-CPT-cAMPS ist ein spezifischer PKA-Inhibitor und PKI stellt einen kompetitiven Inhibitor der PKA dar. Als Stimuli wurden das Diterpen Forskolin und das cAMP-Analog Sp-5,6-DCI-cBiMPS verwendet. Nachgewiesene Signalwege sind durch einen durchgängigen Pfeil gekennzeichnet, putative Signalwege und Verzweigungen mit einem gestrichelten Pfeil.

Weder in der Promotoranalyse von FORSSMANN *et al.* 2002 noch in der hier durchgeführten Analyse konnten CRE-Bindungsmotive ermittelt werden. Es existieren in der Literatur Hinweise, daß PKA unabhängig von CREB- oder CRE-Elementen zur Beeinflussung der Genexpression führen kann. So kann zum Beispiel monomeres pCREB mit anderen Transkriptionsfaktoren der bZIP-Proteinfamilie

Heterodimere bilden. BENBROOK & JONES (1994) zeigten, daß C-JUN/CREB2 Heterodimere mit höherer Affinität an CRE-Elemente als an AP-1-Elemente binden. Des weiteren ist beschrieben, daß PKA durch die Aktivierung des Raf-Proteins den Ras/MAPK-Signalweg induzieren kann (HOUSLAY & KOLCH 2000, LIEBMANN 2001). Dies wiederum könnte in der von NAKAJIMA *et al.* (1993) ermittelten Aktivierung von C/EBP β resultieren. Derartige Mechanismen könnten erklären, warum es trotz fehlender CRE-Elemente zur Promotoraktivierung via PKA kommen kann. Die nachgewiesenen Signalmoleküle und die dazugehörigen Signalwege sowie mögliche Interaktionen in der IL-6-Signalweiterleitung sind in Abbildung 34 zusammengefaßt und schematisch dargestellt.

4.2.2.4 *Untersuchung IL-1 β -responsiver Transkriptionsfaktoren nach Protein Tyrosinkinase-Aktivierung*

Die signalweiterleitende Polypeptidkette IL-RACp des IL-1-Rezeptorkomplexes besitzt wie erwähnt keine intrinsische Protein Tyrosinkinase-Aktivität. Von CROSTON *et al.* (1995) und CAO *et al.* (1996) ist die Serin/Threonin Kinase "Receptor associated Kinase" (IRAK) als Tyrosinkinase für IL-1RI ermittelt worden. Nach Phosphorylierung von IRAK kommt es zu einer direkten Interaktion mit dem TRAF6-Protein, die vermutlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B führt (CAO *et al.* 1996). NF κ B stellt einen gut charakterisierten Transkriptionsfaktor dar, der speziell in Immun- und Inflammationsreaktionen beteiligt ist (LENARDO & BALTIMORE 1989). Ein NF κ B-Bindungselement in der Promotorregion von CCL15 wurde von FORSSMANN *et al.* (2002) identifiziert und in einer weiteren bioinformatischen Analyse in dieser Arbeit bestätigt. Eine Beteiligung von NF κ B in der untersuchten IL-1 β -Signalkaskade konnte unter Verwendung der pharmakologischen Inhibitoren NF- κ B SN 50 und BAY 11-7085 im Luciferase-Reportergen Test allerdings nicht gezeigt werden.

4.2.2.5 *IL-1 β -induzierte Promotoraktivierung über Wege der MAPK-Signalkaskade*

In der Literatur ist eine Beteiligung der MAP-Kinase-Signalkaskaden sowohl von MAPK, JNK als auch p38 in der IL-1-induzierten Signalweiterleitung publiziert (WHITMARSH *et al.*, 1997, WILMER *et al.*, 1997, O'NEILL & GREENE 1998). In dieser Arbeit konnte in Western-Blot Analysen sowie im Luciferase-Reportergen Test gezeigt werden, daß MAPK und p38 in der IL-1 β -Signalweiterleitung involviert sind.

4.2.2.6 *IL-1 β -induzierte Promotoraktivierung über den Ras/MAPK-Signalweg*

In Western-Blot Analysen von IL-1 β -stimulierten HuH-7 Wildtyp Zellen konnte eine Induktion der MAPK nachgewiesen werden und deutet auf eine Beteiligung der MAPK an der IL-1 β -vermittelten CCL15-Expression hin. Die Vernetzungsmöglichkeiten innerhalb des MAPK-Signalwegs bieten vielfältige Mechanismen der Expressionsregulation von CCL15 und gewährleisten somit eine exakte Adaption. Dies ist gerade im Übergang zu einer chronischen Entzündung sowie in deren Verlauf von wesentlicher Bedeutung und untermauert die Annahme einer Beteiligung von CCL15 in chronischer Inflammation. Wie schon in der Diskussion der IL-6-induzierten Promotoraktivierung von CCL15 beschrieben, mündet der Ras/MAPK-Signalweg in der Aktivierung von C/EBP β , welches Heterodimere mit Untereinheiten von NF κ B, CREB/ATF und AP-1 bilden kann (LECLAIR *et al.*, 1992, VALLEJO *et al.*, 1993, HSU *et al.*, 1994). Nach dem Nachweis einer MAPK-Beteiligung im IL-1 β -Signalweg, müßten die verschiedenen Wirkmechanismen der MAPK in einer IL-1 β -induzierten CCL15-Aktivierung sowie MAPK-responsive Transkriptionsfaktoren in weiteren Untersuchungen näher analysiert werden. Für die Betrachtung der CCL15-Regulation wäre zudem ein Vergleich zwischen der MAPK-Signalkaskade via IL-1 β und IL-6 von Interesse.

4.2.2.7 *IL-1 β -induzierte Promotoraktivierung über den p38-Signalweg*

Durch Inkubation mit dem p38-spezifischen Inhibitor SB 203580 konnte eine Reduktion der IL-1 β -induzierten Promotoraktivierung in HuH-7 Zellen nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Daten ist eine Beteiligung der p38 in der IL-1 β -vermittelten CCL15-Expression zu vermuten. Dieser zweite IL-1 β -responsive Signalweg der MAP-Kinasen ist durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli wie bakterielle Pathogene oder Zytokine aktivierbar (ONO & HAN 2000). Die Gruppe der p38-Kinasen ist in Inflammation, Zellwachstum und Zelldifferenzierung sowie in Zellzyklus und Zelltod involviert (ONO & HAN 2000). Über eine Kaskade hintereinander geschalteter MAPKKK und MAPKK kommt es zur Aktivierung der MAPK p38 (HOUSLAY & KOLCH 2000). Unterhalb der p38 kommt es zu einer Diversifizierung und umfassenden Verzweigung der Signalwege auf Ebene von Proteinkinasen sowie Transkriptionsfaktoren (siehe 1.1.3.1.2), die diverse Möglichkeiten der Transkriptionsregulation von CCL15 bieten. Es ist denkbar, daß die von p38 ausgehende Signalkaskade im Verlauf von akuter zu chronischer Entzündung variiert und durch zusätzliche Mediatoren beeinflussbar ist. Untersuchungen der Signalweiterleitung stromabwärts der p38 wären für das Verständnis der CCL15-Aktivierung nützlich, gestalten sich jedoch aufgrund der Komplexität als nicht ganz trivial. Es ist hierbei zu berücksichtigen, daß der p38-Signalweg nicht nur sehr komplex ist, sondern *in vivo* weitere Substanzen an der CCL15-Regulation beteiligt sein könnten, die über intrazelluläre Signalwege einen Einfluß nehmen.

4.2.2.8 Identifizierung von PKA in der IL-1 β -Signalweiterleitung

In den Arbeiten von CHEDID & MIZEL und O'NEILL *et al.* wurde 1990 eine Beteiligung der Proteinkinase A (PKA) in der IL-1 β -Signalweiterleitung nachgewiesen. Experimente mittels Luciferase-Reportergen Test, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, weisen ebenfalls auf eine Beteiligung der PKA in der IL-1 β -vermittelten Promotoraktivierung hin. Eine Inkubation mit dem PKA-spezifischen, zellpermeablen cAMP-Analog Sp-5,6-DCI-cBiMPS (SANDBERG *et al.*, 1991, SCHWEDE *et al.*, 2000) und dem Diterpen Forskolin (SOUZA *et al.*, 1983) führte zur Aktivierung des pCC-2-luc-Promotorkonstrukts. Für die Kostimulation mit IL-1 β konnte eine mehr als additive Luciferaseaktivität detektiert werden. Es ist anzunehmen, daß die Signalweiterleitung über unterschiedliche Wege mediiert wird, die synergistisch zusammenwirken. Die PKA-Signalkaskade ist in einer Vielzahl physiologischer Prozesse involviert und ist durch entsprechende Rückkopplungsmechanismen gut regulierbar und kontrollierbar. So kann nach dem Nachlassen der externen Signale ein rasches Abklingen des cAMP-Spiegels durch Phosphodiesterasen erzielt werden und somit zur Reduktion der PKA-Aktivierung führen. Ein solcher Regelmechanismus in der Aktivierung des Chemokins CCL15 ist sowohl in akuter als auch chronischer Entzündung sinnvoll. Es kann somit eine unnötige Schädigung des Organismus durch übermäßige Rekrutierung phagozytischer Immunzellen verhindert werden sowie die Progression der Fibrose zum Stillstand gebracht und eine Zirrhose vermieden werden.

CHEDID & MIZEL und O'NEILL *et al.* beschreiben 1990 den zugrunde liegenden Mechanismus der PKA-Aktivierung via IL-1. Dieser besteht in der Kopplung des IL-1-Rezeptors an ein G-Protein, das die Aktivierung der Adenylat-Zyklase bewirkt und somit zur Phosphorylierung der PKA führt. Von O'NEILL *et al.* (1990) wurde gezeigt, daß der IL-1-induzierte Effekt durch die Inkubation mit Pertussis-Toxin gehemmt werden kann. Zum Nachweis einer IL-1 β -induzierten PKA-Aktivierung über ein G-Protein, müßten anschließende Experimente mit Pertussis-Toxin durchgeführt werden.

4.2.2.9 Identifizierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) in der IL-1 β -Signalweiterleitung

In der Publikation von AURON (1998) wird die Rekrutierung und Phosphorylierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) an die Liganden-bindende Polypeptidkette IL-1RI beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Untersuchungen im Luciferase-Reportergen Test die Beteiligung der PI3K im IL-1 β -Signalweg nachgewiesen werden. Die Inkubation IL-1 β -stimulierter HuH-7 Zellen mit dem pharmakologischen Inhibitor Ly 294002 führte zu einer signifikanten Reduktion der Luciferaseaktivität und ließ eine Beteiligung der PI3K an der IL-1 β -vermittelten CCL15-Aktivierung vermuten.

Die durch PI3K auslösbaren Effekte sind vielfältig und umfassen unter anderem die Aktivierung des Ras-Proteins (RODRIGUEZ-VICIANA *et al.*, 1994, HU *et al.*, 1995) sowie bestimmter Isoformen der PKC (TOKER *et al.*, 1994, AKIMOTO *et al.*, 1996). Als Funktion der PI3K im IL-1 β -Signalweg konnte bisher eine Aktivierung von NF κ B und AP-1 gezeigt werden (REDDY *et al.*, 1997, AURON 1998). Die Promotoranalyse (Kapitel 3.1.3.4) hat ein NF κ B- und AP-1-Element ermittelt sowie drei weitere AP1FJ Motive, so daß beide Wege theoretisch möglich wären. Eine Beteiligung von NF κ B konnte im Luciferase-Reporter-Test jedoch nicht nachgewiesen werden. Es ist möglich, daß PI3K zur Aktivierung von AP-1 führt und somit positiv zur CCL15-Expression beiträgt. Zudem wäre denkbar, daß PI3K über die Aktivierung des Ras-Proteins die Ras/MAPK-Signalwege aktiviert, denn eine Induktion der MAPK und p38 konnte hier in Western-Blot Analysen bzw. im Luciferase-Reporter-Test nachgewiesen werden.

4.2.2.10 Identifizierung von JAK2 als putative IL-1-Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase

Entgegen den Erwartungen konnte im Luciferase-Reporter-Test die IL-1 β -vermittelte Promotoraktivierung durch Verwendung des spezifischen Inhibitors Tyrphostin AG 490 (AL-SHAMI *et al.*, 1999) gehemmt werden. Die Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung der JAK2 an der Promotorinduktion durch das Interleukin IL-1 β schließen. In der Literatur gibt es bis dato keinerlei Nachweis einer Interaktion zwischen dem IL-1-Rezeptorkomplex und Mitgliedern der Janus Kinasen. JAK-Kinasen binden nur Typ I und Typ II Rezeptoren, IL-1RI zählt jedoch zu den Typ IV Zytokin-Rezeptoren. Auch eine Interleukin-1-vermittelte JAK-Aktivierung ist nicht bekannt. Die Identifizierung einer JAK-Kinase in der IL-1 β -vermittelten CCL15-Expression ist von großem Interesse. Ein möglicher JAK/STAT-Signalweg ist gerade in akuten Entzündungsprozessen sowie in einer schnellen und effektiven Elimination von Pathogenen für den Organismus von großer Bedeutung. Eine schnelle und direkte Aktivierung des Chemokins CCL15 und daraus resultierend die Rekrutierung von Leukozyten wäre äußerst sinnvoll. Nähere Untersuchungen einer Beteiligung von JAK2 an der IL-1 β -induzierten CCL15-Expression in nachfolgenden Arbeiten nimmt hohe Priorität ein. Abbildung 35 zeigt in einem schematischem Überblick die detektierten Signalmoleküle PKA, MAPK, p38, PI3K und JAK2 und die daraus resultierenden Signalwege sowie putative Verbindungen innerhalb und zwischen den einzelnen Mediatoren.

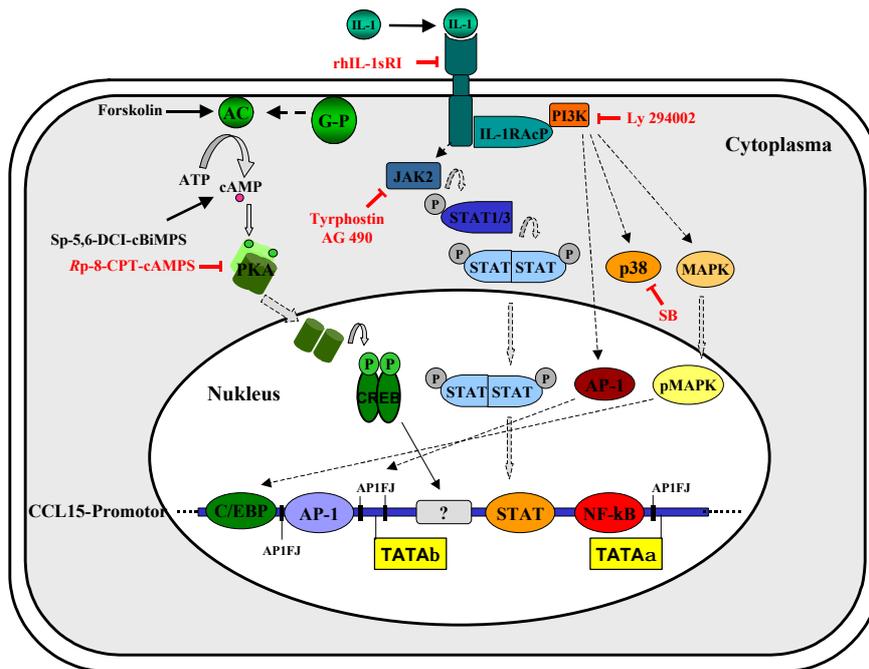


Abbildung 35

Schematische Darstellung putativer Signalwege in der IL-1 β - und PKA-vermittelten pCC-2-luc-Aktivierung. Es sind die aus Inhibitorexperimenten und Western-Blot Analysen ermittelten Signalmoleküle (PKA, JAK2, MAPK, p38, PI3K) und die daraus resultierenden Signalwege mit möglichen Verzweigungen aufgeführt. Zudem sind die putativen, für die Signalwege relevanten responsiven Elemente des CCL15-Promotors dargestellt. C/EBP β : CAAT/Enhancer binding protein β , AP-1: Activator-Protein-1, APlFJ: Activator-Protein-1 Fos-Jun, NFAT: Nuclear factor of activated T cells, STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription, NF κ B: Nuclear Factor- κ B, TATA α : bekannte TATA-Box, TATA β : neu ermittelte TATA-Box. Die verwendeten Inhibitoren sind durch einen Balken markiert und rot dargestellt. Es wurde der IL-1Rezeptor-blockierende Antikörper rhIL-1RI verwendet, der spezifische JAK2-Inhibitor Tyrrhostin AG 490, Rp-8-CPT-cAMPS, ein spezifischer PKA-Inhibitor, PKI, ein kompetitiver Inhibitor der PKA, der p38-Inhibitor SB 203580 und Ly 294002, der PI3K hemmt. Das Diterpen Forskolin und das cAMP-Analog Sp-5,6-DCI-cBiMPS wurden als Stimuli des PKA-Signalwegs verwendet. Nachgewiesene Signalwege sind durch einen durchgängigen Pfeil gekennzeichnet, putative Signalwege und Verzweigungen mit einem gestrichelten Pfeil.

4.2.2.11 Divergenz zwischen den Luciferase-Reportergen Testergebnissen und den Analysen mittels TaqMan, semiquantitativer RT-PCR und RIA

Ein letzter zu diskutierender Punkt ist die Diskrepanz zwischen den erhaltenen Daten des Luciferase-Reportergen Test und den Ergebnissen der TaqMan-Analyse, semi-quantitativer RT-PCR und des RIA. Im Luciferase-Reportergen Test konnte eindeutig eine Promotorinduktion durch Stimulation mit den Interleukinen IL-1 β und IL-6 ermittelt werden (siehe 3.1.1.3). Eine erhöhte CCL15-Expression nach Inkubation mit IL-1 β oder IL-6 konnte hingegen in Analysen mittels quantitativer PCR, semi-quantitativer RT-PCR oder RIA nicht nachgewiesen werden (3.1.3.1, 3.1.3.2, 3.1.3.3). Der Nachweis von CCL15-Transkript bzw. Protein war möglich, ein Unterschied zwischen stimuliert und Kontrolle (unstimuliert) hingegen nicht. Da mit allen drei Techniken der Nachweis von CCL15-mRNA bzw.

CCL15-Protein prinzipiell möglich ist, ist ein Fehler in den verwendeten Techniken schwer vorstellbar. Für die *TaqMan*-Analysen sowie die semi-quantitative RT-PCR und den RIA wurden HuH-7 Zellen mit IL-1 β oder IL-6 inkubiert, was wiederum zur Aktivierung des endogenen CCL15-Promotors führen sollte. Im Luciferase-Reporter-gen Test hingegen wurde den Zellen mittels Transfektion ein Promotorkonstrukt mit der potentiellen Promotorregion des humanen CCL15 eingeschleust. Es wäre denkbar, daß das verwendete Promotorkonstrukt nicht die vollständige Promotorsequenz enthält und relevante regulatorische Elemente fehlen.

Zudem ist vorstellbar, daß die Sequenz des intrinsischen Promotors der HuH-7 Zellen von dem eigentlichen CCL15-Promotor abweicht und eventuell Bindungselemente für Transkriptionsfaktoren enthält, die Interleukin-responsiv sind und zur Repression der Genexpression führen. CCL15 wäre somit in HuH-7 Zellen durch die Interleukine IL-1 β und IL-6 nicht induzierbar. HuH-7 Zellen würden in diesem Fall der erwarteten *in vivo* Situation entsprechen und wären für Experimente endogener CCL15-Expression nicht geeignet.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit basiert auf dem strukturellen Aufbau des Luciferase-Reporter-gen-Vektors pGL-2 Basic, der für die Erstellung des Promotorkonstrukts pCC-2-luc genutzt wurde. Es ist nicht auszuschließen, daß dieser DNA-Sequenzen beinhaltet, die Interleukin-responsiv sind und die detektierte pCC-2-luc Aktivierung induzieren. Die Ergebnisse des Aktivitätsvergleichs des Promotorkonstrukts pCC-2-luc und des verkürzten Konstrukts Δ pCC-2-luc könnten somit ebenfalls erklärt werden. Aufgrund einer durchgeführten BLAST-Analyse konnten mehrere EST-Klone detektiert werden, die den Bereich von -293 bp bis in das erste Exon hinein umfassen. Die verbleibende Promotorsequenz enthält Bindungselemente für AP-1- und C/EBP β sowie die TATA β -Box (siehe 3.1.3.4), die als wesentliche Elemente der Transkriptionsaktivierung vermutet wurden. Die Deletion der AP-1- und C/EBP β -Bindungsmotive sowie der TATA β -Box hatte jedoch keinen Einfluß auf die Interleukin-1 β und PKA-induzierte Promotorinduktion. Interleukin-1 β sowie das Diterpen Forskolin führten bei beiden Konstrukten zu einer Promotoraktivierung in gleicher Höhe. Eine weitere Erklärung dieses Ergebnisses basiert auf der verbleibenden Promotorsequenz von Δ pCC-2-luc. Es ist denkbar, daß dort weitere Interleukin-responsive Bindungselemente lokalisiert sind, die zur Promotorinduktion führen. Ausgehend von der durchgeführten bioinformatischen Promotoranalyse könnten AP1FJ, STAT oder NF κ B als potentielle regulatorische Bindungsmotive aufgeführt werden. Dies würde auch mit den ermittelten Mediatoren und den daraus resultierenden Signalwegen übereinstimmen. Die Janus Kinase JAK2 würde zur Phosphorylierung von STAT-Proteinen führen, PI3K könnte eine AP-1- und NF κ B-Aktivierung induzieren. AP1FJ und NF κ B könnten zudem durch Heterodimerbildung mit C/EBP β über den MAPK-Signalweg angesprochen werden.

Abschließend betrachtet kann die vermutete Funktion des CC-Chemokins CCL15 einer Beteiligung in chronischen Entzündungsreaktionen der Leber sowie an der Entstehung einer Zirrhose durch die erhaltenen Daten bekräftigt werden. Speziell die Induktion durch die Interleukine IL-1 β und IL-6

sowie die Interferone IFN- α und IFN- γ weisen eindeutig auf ein inflammatorisches CC-Chemokin hin. Zudem scheint die Eliminierung von pathogenen Substanzen in verschiedenen Geweben (Leber, Niere, Darm, Lunge und Luftröhre) in das Wirkspektrum von CCL15 zu zählen.

4.3 Etablierung eines zirkadianen peripheren Oszillatorsystems in der humanen Hepatoma Zelllinie HuH-7

Die Untersuchungen in dieser Arbeit befassen sich mit dem humanen Oszillatorsystem der Leber. Bisher ist die Expression zirkadianer Oszillatorgene des Menschen noch unklar (TAKATA *et al.*, 2002). Die Charakterisierung der Regulation von *hPer1* in der humanen Hepatoma Zelllinie HuH-7 soll Rückschlüsse über den Aufbau humaner peripherer Oszillatorsysteme liefern. Die Untersuchungen wurden mittels Luciferase-Reportergen Test unter Verwendung des Promotorkonstrukts *hPER1-luc* durchgeführt. Dieses enthält einen Sequenzbereich des humanen *Period1* Promotors sowie eine Teilsequenz des ersten Exons. Als weitere Komponenten des zirkadianen Zeitsystems wurden mCLOCK, mBMAL1 und mCRY2 in Form von Expressionsplasmiden in transienten Kotransfektionen in die Zellen eingeschleußt. Mit diesem System konnte erstmalig ein komplettes peripheres zirkadianes System in einer humanen Leberzelllinie nachgewiesen werden, das dem von KUME *et al.* (1998) beschriebenen Prinzip der negativen Rückkopplung folgt. Hierbei konnte gezeigt werden, daß die Transkription des negativen Uhrengens *hPer1* durch die Transkriptionsfaktoren CLOCK/BMAL1 aktiviert, und durch CRY2 konzentrationsabhängig gehemmt wird. Die Verwendung von Faktoren murinen Ursprungs, in einem ansonsten humanen Oszillatorsystem, hatte keinen negativen Einfluß. Dies war aufgrund der Sequenzidentität von 92% zwischen *hPer1* und *mPer1* zu erwarten und weist auf eine hohe Konserviertheit zwischen den Spezies hin (TEI *et al.*, 1997). Die erhaltenen Daten untermauern die Existenz eines peripheren Oszillatorsystems der humanen Leber und zeigen am Beispiel der *hPer1*-Expression erstmals das Zusammenspiel der verschiedenen Uhrengene. Zudem bestärken sie durch ein *in vitro* Zellsystem die Theorie, daß jede Zelle peripherer Gewebe eine eigene innere Uhr besitzt (BALSALOBRE 2002). Des weiteren bekräftigen die erhaltenen Daten die Vermutung, daß die Generierung der zirkadianen Oszillation in peripheren Zellen nach einem ähnlichen Mechanismus abläuft wie im SCN. Untersuchungen der *hPer2*- und *hClock*-Expression von TAKATA *et al.* (2002) bekräftigen diese Annahme. Sie konnten mittels RT-PCR in peripheren Blut Mononukleären Zellen (PBMCs) deutliche tagesabhängige Unterschiede in der Menge an *hPer2*-mRNA detektieren, wohingegen *hClock* keine Tagesvarianzen in der Expression aufweist. Dies entspricht den Kenntnissen über das zentrale zirkadiane Oszillatorsystem und paßt zu den im Luciferase-Reportergen Test erhaltenen Daten. BJARNASON *et al.* (2001) konnten zudem eine rhythmische Expression von *hPer1*, *hCry1* und *hBmal1* in der Mundschleimhaut und Haut

nachweisen, eine Interaktionen zwischen den einzelnen zirkadianen Komponenten wurde jedoch nicht gezeigt. Dies war erstmalig mit dem in dieser Arbeit etablierten System möglich.

Es wird angenommen, daß nur der Oszillator des SCN zur Selbsterhaltung zirkadianer Rhythmik befähigt ist. Periphere Oszillatoren benötigen zur Aufrechterhaltung und/oder Synchronisation der Rhythmik zusätzliche externe Signale. So konnte von YAMAZAKI *et al.* (2000) gezeigt werden, daß die *mPer1*-Oszillation in Gewebekulturen peripherer Organe rasch abschwächt, wohingegen der zirkadiane Rhythmus im SCN über Wochen erhalten bleibt. Ein wichtiger externer *Zeitgeber* des Oszillators der Leber stellt die Nahrung dar, Licht hingegen nimmt im Gegensatz zum SCN keinen Einfluß auf das zirkadiane System. Das Oszillatorsystem des SCN und der Leber scheinen demnach auf verschiedene Stimuli zu reagieren, woraus vermutlich andere Mechanismen und Mediatoren der Signalweiterleitung resultieren. In verschiedenen Studien konnten bisher verschiedene Komponenten detektiert werden, die in kultivierten Fibroblasten oder anderen Zellpopulationen zur Steuerung der Expression von *Per*-Genen und/oder zirkadianer Genexpression befähigt sind (AKASHI & NISHIDA 2000, BALSALOBRE *et al.*, 2000, MOTZKUS *et al.*, 2000, YAGATI & OKAMURA 2000, NONAKA *et al.*, 2001). Hierbei wurden Glukokortikoide und Forskolin ermittelt, sowie einige Faktoren, die in einer vermehrten cAMP-Produktion resultieren. Zudem wurde der Phorbol-ester „12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat“ (TPA) und einige Wachstumsfaktoren detektiert, die zur Aktivierung der PKC- und MAPK-Signalwege führen sowie Calcimycin, das die intracytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration erhöht. In nachfolgenden Experimenten wurde untersucht, ob in HuH-7-Zellen, wie von MOTZKUS *et al.* (2000) beschrieben, eine CLOCK/BMAL1-unabhängige *hPER1*-luc-Induktion durch PKA- und PKC-aktivierende Substanzen induziert werden kann.

4.4 Induktion der *hPER1*-Expression via PKA und PKC

Für die Analyse einer CLOCK/BMAL1-unabhängigen *hPER1*-Expression via PKA bzw. PKC, wurden HuH-7 Zellen nach *hPER1*-luc-Transfektion für 6 h mit der PKC-stimulierenden Substanz PMA und den PKA-stimulierenden Agentien *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS und Forskolin inkubiert. Zudem wurde eine Kotransfektion mit einem Expressionsplasmid durchgeführt, das für $C\alpha$, ein Isoenzym der katalytischen PKA-Untereinheit, kodiert. Die Daten dieser Untersuchungen zeigen, daß außer einer *hPER1*-luc-Induktion via CLOCK/BMAL1 auch eine CLOCK/BMAL1-unabhängige Promotoraktivierung durch PKA und PKC induziert werden kann und bestärken die Daten von MOTZKUS *et al.* (2000) einer CLOCK/BMAL1-unabhängigen Regulation von *hPer1* via PKA und PKC in HuH-7 Zellen. Hieraus resultiert die Vermutung, daß die Proteinkinasen PKA und PKC intrazelluläre Signalmoleküle darstellen, die in der Aufrechterhaltung und Synchronisation des humanen peripheren Oszillatorsystems der Leber beteiligt sind. Die Kostimulation mit *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS bzw. Forskolin und PMA resultiert in einer mehr als additiven Promotoraktivierung, was mit den von MOTZKUS *et al.*

(2000) gezeigten Ergebnissen übereinstimmt. Aufgrund der Daten ist zu vermuten, daß mindestens zwei konvergente Signalwege an der PKA- und PKC-induzierten *hPer1*-Aktivierung beteiligt sind.

PKA und PKC sind durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli induzierbar und können in einer ebenso vielfältigen Aktivierung weiterführender Signalmoleküle resultieren. Zur genauen Analyse der PKA- und PKC-vermittelten *hPER1*-luc-Aktivierung sowie den daran beteiligten Mediatoren wurden putative Signalmoleküle im Luciferase-Reporter-Gen Test charakterisiert. Die CLOCK/BMAL1-induzierte Promotoraktivierung wurde parallel hierzu nach dem gleichen Prinzip untersucht, um einen Vergleich der drei Signalwege (CLOCK/BMAL1, PKA, PKC) ziehen zu können.

4.4.1 *Beteiligte Signalmoleküle an der CLOCK/BMAL1-induzierten hPER1-Aktivierung*

Für die CLOCK/BMAL1-induzierte *hPer1*-Aktivierung konnten Hinweise auf bisher nicht detektierte Signalproteine (AP-1, C/EBP) im zirkadianen Oszillatorsystem aufgezeigt werden.

Des Weiteren haben die ermittelten Daten den Nachweis erbracht, daß die CLOCK/BMAL1-induzierte Promotoraktivierung von *hPER1*-luc PKA-unabhängig verläuft. Das läßt vermuten, daß keine direkte Beteiligung der PKA im negativen Rückkopplungsmechanismus des peripheren Oszillatorsystems der Leber vorliegt, sondern PKA regulierend auf den zirkadianen Rhythmus einwirkt und somit zur Erhaltung und Synchronisation dessen beiträgt.

Der Nachweis einer Beteiligung von C-FOS bzw. in dimerisierter Form von AP-1 sowie von C/EBP an der CLOCK/BMAL1-induzierten *hPER1*-luc-Promotoraktivierung läßt auf eine Rolle von AP-1 und C/EBP im negativen Rückkopplungsmechanismus des peripheren Oszillators der Leber schließen. Eine solche Funktion der Transkriptionsfaktoren AP-1 und C/EBP ist bis dato nicht bekannt und von großem Interesse. AP-1 und C/EBP gehören zu der Familie der "basic leucin zipper" (bZIP) Proteine, die durch hohe Homologie in ihrer Aminosäuresequenz und ähnliche Bindungsmotive charakterisiert sind, sowie der Fähigkeit untereinander Heterodimere zu bilden. Im SCN konnte eine Licht-induzierte Expression von *c-fos* und *Jun-B* nachgewiesen werden (ARONIN *et al.*, 1990, KORNHAUSER *et al.*, 1992), woraus die Vermutung einer Beteiligung von AP-1 an der Synchronisation des zirkadianen Rhythmus an den Licht/Dunkel-Zyklus resultierte. Eine direkte Beteiligung in der negativen Rückkopplung des zentralen zirkadianen Oszillators oder peripherer Oszillatoren, worauf die vorliegenden Daten hinweisen, ist bisher nicht bekannt.

Ein weiteres bZIP-Protein, das zur Unterfamilie der PAR-Proteine gehört, ist das „albumin gene D-site binding protein“ (DBP). DBP weist eine rhythmische Expression im SCN sowie mehreren peripheren Geweben auf (LOPEZ-MOLINA *et al.*, 1997). Es ist im zentralen Oszillatorsystem des SCN an einem weiteren Rückkopplungsmechanismus beteiligt, der in einer additiven Zunahme der *mPer1*-Transkription resultiert (YAMAGUCHI *et al.*, 2000). Hierbei bindet das PAR-Protein direkt an eine Bindungssequenz von -28 bis -37 in der *mPer1*-Promotorregion, die hinter der dritten E-Box

lokalisiert ist (+1 determiniert den Transkriptionsstart). Es ist vorstellbar, daß außer DBP noch andere bZIP-Proteine, wie beispielsweise die ermittelten Transkriptionsfaktoren AP-1 und C/EBP, durch einen ähnlichen Mechanismus in die *hPer1*-Expression involviert sind. Interessanterweise beschreibt FALVEY *et al.* (1996), daß C/EBP und DBP wesentliche Gemeinsamkeiten aufweisen. Sie zeigen ein ähnliches Expressionsmuster und aktivieren die Transkription durch Anlagerung an ähnliche DNA-Bindungssequenzen. Hierbei besitzt C/EBP eine geringere Bindungsspezifität als DBP, so daß auch eine Bindung von C/EBP an putative DBP-Bindungsmotive vorstellbar wäre. Eine Heterodimerisierung beider bZIP Proteine hingegen scheint nicht möglich (FALVEY *et al.*, 1996). Die Ähnlichkeit von C/EBP und DBP bestärkt die Vermutung einer Beteiligung von C/EBP an der *hPer1*-Induktion. Zudem sind sowohl für C/EBP als auch für AP-1 DNA-Bindungsmotive im *hPer1*-Promotor lokalisiert. Hierbei liegt das putative responsive AP-1-Element nur wenige Basen hinter der mittleren E-Box lokalisiert. Für C/EBP wurden drei putative C/EBP β -responsive Elemente detektiert, die sich sehr eng beieinander hinter dem AP-1-Element befinden. Die CLOCK/BMAL1-induzierte *mPer1*-Aktivierung wird, wie von GEKAKIS *et al.* (1999) beschrieben, über die Bindung des Heterodimers an die E-Box-Elemente des *mPer1*-Promotors vermittelt. Da regulatorische Gene auch miteinander in Wechselwirkung treten können, ist vorstellbar, daß C/EBP und AP-1 über Anlagerung an die detektierten Bindungsmotive die *hPer1*-Expression beeinflussen können und so eine variable Steuerung ermöglichen.

Die auf den Daten des Luciferase-Reportergen Test basierende Vermutung einer direkten Beteiligung von AP-1 und C/EBP an der CLOCK/BMAL1-induzierten *hPer1*-Expression weist auf neue Mechanismen in der Regulation des zirkadianen Oszillatorsystems hin. In Folgeversuchen müßte der genaue Wirkmechanismus von C-FOS bzw. AP-1 und C/EBP in der *hPer1*-Aktivierung ermittelt werden.

4.4.2 Putative Signalmoleküle in der PKA-vermittelten *hPER1*-Aktivierung

Daten dieses Experiments lassen eine Beteiligung von pCREB und C/EBP an der PKA-induzierten *hPER1*-luc-Aktivierung vermuten. Dies stimmt mit Daten von MOTZKUS *et al.* (2000) überein, die in HuH-7 Zellen eine Induktion von CREB via PKA gezeigt hatten. Eine Beteiligung der MAPK an der PKA-vermittelten CREB-Phosphorylierung konnte in ihren Untersuchungen nicht gezeigt werden. OBRIETAN *et al.* (1998) hingegen zeigten im SCN eine Aktivierung von CREB durch MAPK. Dies kann in einer unterschiedlichen Organisation des zentralen Oszillators des SCN und den Oszillatorsystemen peripherer Gewebe, in diesem Fall der Leber, begründet sein. Die Analyse einer putativen MAPK-Beteiligung an der *hPer1*-Induktion, unter Verwendung geeigneter Inhibitoren im Luciferase-Reportergen Test, wäre von Interesse. Es ist zu vermuten, daß die aus HuH-7-Zellen gewonnenen Daten von MOTZKUS *et al.* (2000) in dem etablierten System bestätigt werden und keine

Beteiligung der MAPK in der PKA-induzierten *hPER1*-luc-Aktivierung vorliegt. Für die Funktion im zirkadianen System ist, aufgrund fehlender Beteiligung an der CLOCK/BMAL1-induzierten *hPer1*-Aktivierung zu vermuten, daß PKA an der Synchronisation des peripheren Oszillators der Leber beteiligt ist. Der ermittelte Transkriptionsfaktor CREB stellt hierbei ein bedeutendes Element dar. Im Hinblick auf eine putative CREB-Beteiligung ist anzumerken, daß für den PKA-responsiven Transkriptionsfaktor CREB keine CRE-Bindungselemente in der bioinformatischen Analyse des *hPER1*-luc-Promotors detektiert werden konnten. Es ist jedoch bekannt, daß CRE mit anderen Monomeren der bZIP-Familie Heterodimere bilden kann (BENBROOK & JONES 1994). Es wäre vorstellbar, daß CRE durch Heterodimerbildung mit JUN- oder FOS-Monomeren sowie C/EBP und Bindung an deren DNA-Bindungssequenzen regulierend in die *hPer1*-Induktion eingreift.

4.4.3 Putative Signalmoleküle in der PKC-vermittelten *hPER1*-Aktivierung

Im Gegensatz zur PKA-vermittelten Promotoraktivierung konnte eine Beteiligung von CREB an der *hPER1*-luc-Induktion via PKC nicht eindeutig gezeigt werden. Ein Mitwirken des bZIP-Proteins C/EBP ist ebenfalls unklar. Für eindeutige Aussagen müßten weitere Versuche durchgeführt werden. Es könnten zum Beispiel im Luciferase-Reportergen Test Untersuchungen mit einem für PKC kodierenden Expressionsplasmid durchgeführt werden, das mit A-CREB, K-CREB und C-C/EBP kotransfiziert wird.

Der Transkriptionsfaktor AP-1 konnte in der PKA/PKC-vermittelten Promotoraktivierung nachgewiesen werden, jedoch nicht im PKA-Signalweg. Es ist anzunehmen, daß AP-1 aufgrund dessen in der PKC-induzierten *hPer1*-Induktion involviert ist. Eine putative Beteiligung von AP-1 an der Synchronisation des peripheren Oszillatorsystems der Leber erscheint interessant, da bereits im SCN eine Licht-induzierte Expression von *c-fos* und *Jun-B* ermittelt werden konnte, und eine Beteiligung an der Synchronisation der zirkadianen Rhythmik an den Licht/Dunkel-Zyklus der Umgebung vermutet wurde.

Untersuchungen bezüglich einer MAPK-Beteiligung in der PKC-Signalweiterleitung sind aufgrund der Daten von AKASHI & NISHIDA (2000) von Interesse. Diese konnten in NIH-3T3 Zellen zeigen, daß TPA über PKC zur Aktivierung des MAPK-Signalwegs führt und in der Synchronisation zirkadianer Genexpression resultiert. Dies stimmt mit Daten in HuH-7 Zellen von MOTZKUS *et al.* (2000) überein, der nach PMA-Inkubation eine Aktivierung von MAPK zeigte, jedoch nicht von CREB. Die MAPK-Kaskade ist demnach nicht nur, wie von OBRIETAN *et al.* (1998) gezeigt, ein essentieller Faktor für die normale Funktion des zentralen Oszillators, sondern auch an der Synchronisation peripherer Oszillatoren beteiligt. Es ist denkbar, daß PKC via MAPK zur Aktivierung von C/EBP und/oder AP-1 führt und somit regulierend auf die *hPer1*-Expression einwirkt. Für AP-1 ist von SHAULIAN & KARIN 2002 eine Aktivierung via MAPK durch Serum und Wachstumsfaktoren gezeigt.

4.4.4 Vergleichende Analyse der beteiligten Signalmoleküle in der *hPER1*-Aktivierung via *CLOCK/BMAL1*, *PKA* und *PKC*

Periphere Oszillatorsysteme sind im Gegensatz zum Oszillator des SCN nicht zur Selbsterhaltung zirkadianer Rhythmik imstande und benötigen hierfür externe Signale (1.5.3). Es ist bekannt, daß der zentrale zirkadiane Oszillator über humorale und neuronale Signale zur Synchronisation peripherer Oszillatoren führt. Zudem ist beschrieben, daß Nahrung im peripheren Oszillator einen wesentlichen *Zeitgeber* darstellt. *PKA* und *PKC* scheinen in diesen Abläufen wesentliche Signalmoleküle darzustellen.

In den hier vorliegenden Daten resultieren *PKA* und *PKC* unabhängig von *CLOCK/BMAL1* in einer *hPer1*-Aktivierung und können demnach an der Synchronisation der peripheren Oszillation beteiligt sein. Der *PKA*- wie auch der *PKC*-Signalweg beinhalten Signalmoleküle, die auch in der *CLOCK/BMAL1*-induzierten *hPER1-luc*-Aktivierung detektiert werden konnten. Für *PKA* konnte eine Beteiligung von *C/EBP* nachgewiesen werden, für *PKC* wurde *AP-1* ermittelt, wobei eine Beteiligung von *C/EBP* via *PKC* nicht auszuschließen ist. Es ist denkbar, daß *PKA* und *PKC* durch die Aktivierung der *bZIP*-Proteine *AP-1* und *C/EBP* über die Regulation der *hPer1*-Transkription zur Aufrechterhaltung und Synchronisation des humanen peripheren Oszillators der Leber beitragen. Zudem könnte die Identifizierung unterschiedlicher Mediatoren in der *PKA*- und *PKC*-induzierten Promotorinduktion die gezeigte synergistische *hPER1-luc*-Aktivierung durch Inkubation mit *PKA*- und *PKC*-stimulierenden Substanzen erklären.

Das, in dieser Arbeit etablierte periphere zirkadiane System bietet eine gute Möglichkeit die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu untersuchen. Die erhaltenen Daten haben interessante Hinweise auf weitere, bisher noch unbekannte Transkriptionsfaktoren an der *CLOCK/BMAL1*-induzierten *hPer1*-Expression ergeben, sowie auf Mechanismen der Synchronisation. Weitere Untersuchungen des peripheren Oszillatorsystems in der Leber sind vielversprechend. Es wäre interessant den Expressionsverlauf von *AP-1* und *C/EBP* über 24 h zu untersuchen und mit der zirkadianen Rhythmik des *hPer1*-Gens zu vergleichen. Wirken *AP-1* und *C/EBP*, wie vorstellbar ist, über einen ähnlichen Mechanismus wie *DBP*, ist eine zirkadiane Expression zu erwarten. Weiterhin sind Untersuchungen putativer *AP-1*- und *C/EBP*-Induktion durch einen Serumschock interessant. Dies würde einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung im zirkadianen Oszillatorsystem darstellen. Derartige Studien könnten einen enormen Fortschritt im Verständnis der molekularen Mechanismen peripherer Oszillatorsysteme und dem Aufbau der inneren Uhr bieten.

5 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit war die Charakterisierung der Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung der humanen Gene *CCL15* und *Period1* (*hPer1*) führen, sowie daran beteiligte Signalmoleküle. Die Untersuchungen der Signalweiterleitung wurden in einem Luciferase-Reportergen Test unter der Verwendung der Promotorkonstrukte pCC-2-luc und *hPER1*-luc durchgeführt.

Für das CC-Chemokin *CCL15* ist bisher nur eine limitierte Expression bekannt. Expressionsanalysen dieser Arbeit hingegen zeigen ein weitverbreitetes Vorkommen von *CCL15*, das in der Leber am höchsten ist. Im Luciferase-Reportergen Test konnte in der humanen Hepatoma Zelllinie HuH-7 eine pCC2-luc-Promotorinduktion durch die Interleukine IL-1 β und IL-6 sowie die Interferone IFN- α und IFN- γ nachgewiesen werden. CC-Chemokine sind hauptsächlich für die Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten verantwortlich und wirken generell nicht chemotaktisch auf Neutrophile, die primär in der akuten Entzündung involviert sind. Für *CCL15* konnte die Aktivierung von Monozyten und Lymphozyten von verschiedenen Forschungsgruppen nachgewiesen werden. Die Rekrutierung von Neutrophilen wurde hingegen erst einmalig gezeigt, so daß eine Beteiligung von *CCL15* an chronischen Entzündungsprozessen der Leber vermutete wird. Für IL-1 β und IL-6 ist eine Beteiligung an akuten und chronischen Prozessen der Leber bekannt, so daß eine Interleukin-induzierte *CCL15*-Expression in chronischen Entzündungen der Leber denkbar ist. Die Charakterisierung der IL-6-vermittelten Promotorinduktion ergab eine Beteiligung der JAK2-Kinase, die eine direkte und schnelle Signalweiterleitung gewährleistet sowie der MAPK, die eine wesentlich komplexere Regulation von *CCL15* ermöglicht. Des weiteren wurde eine indirekte Beeinflussung der Promotoraktivität durch PKA detektiert. Für IL-1 β konnte eine putative Beteiligung der Kinasen p38, MAPK, PKA, PI3K und JAK2 nachgewiesen werden. Eine Beteiligung des JAK/STAT-Wegs in der IL-1-Signalweitergabe ist bisher nicht bekannt.

Period1, eine Hauptkomponente im zirkadianen Oszillatorsystem des SCN, wird nach bisherigen Daten durch Heterodimere der bZIP-Proteine CLOCK und BMAL1 induziert und durch CRY gehemmt. Die Oszillatoren peripherer Gewebe sollen nach einem ähnlichen Mechanismus wie im SCN aufgebaut sein und wurden in dieser Arbeit am Beispiel der Leber in HuH-7 Zellen untersucht. Es konnte in dieser Arbeit ein komplettes peripheres zirkadianes System gezeigt werden, bei dem die *hPER1*-luc-Aktivierung dem Prinzip der negativen Rückkopplung folgt. Interessanterweise konnten in der CLOCK/BMAL1-induzierten Promotoraktivierung zwei bisher noch unbekannte Signalmoleküle, AP-1 und C/EBP detektiert werden, die scheinbar direkt an der *hPer1*-Aktivierung beteiligt sind. Weiterhin konnte eine CLOCK/BMAL1-unabhängige *hPER1*-luc-Induktion durch PKA und PKC gezeigt werden. Der Signalweg von PKA weist eine Beteiligung von CREB und C/EBP auf, wohingegen für PKC eine Beteiligung von AP-1 gezeigt werden konnte. Aufgrund der Daten ist zu vermuten, daß diese beiden Wege über die Regulation von *hPer1* an der Synchronisation der peripheren Oszillation beteiligt sind.

6 Literaturverzeichnis

AHN S., OLIVE M., AGGARWAL A., KRYLOV D., GINTY D. & VINSON C. (1998). A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of c-fos. *Mol Cell Biol* **18**: 967-977.

AKASHI M. & NISHIDA E. (2000). Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock. *Genes Dev* **14**: 645-649.

AKIMOTO K., TAKAHASHI R., MORIYA S., NISHIOKA N., TAKAYANAGI J., KIMURA K., FUKUI Y., OSADA S., MIZUNO K., HIRAI S., KAZLAUSKAS A. & OHNO S. (1996). EGF or PDGF receptors activate atypical PKC λ through phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO J* **15**: 788-798.

ALESSI D.R., CUENDA A., COHEN P., DUDLEY D.T. & SALTIEL A.R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* **270**: 27489-27494.

ALLADA R., WHITE N.E., SO W.V., HALL J.C. & ROSBASH M. (1998). A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell* **93**: 791-804.

AL-SHAMI A. & NACCACHE P.H. (1999). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. *J Biol Chem* **274**: 5333-5338.

ARAI K., LEE F., MIYAJIMA A., MIYATAKE S., ARAI N. & YOKOTA T. (1990). Zytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* **59**: 783-836.

AREND W.P. (1993). Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* **54**: 167-227.

ARENDR J. & BROADWAY J. (1987). Light and melatonin as zeitgebers in man. *Chronobiology Intern* **4**: 273-282

ASCHOFF J. (1981). A survey on biological rhythms. In: *Biological Rhythms*, Vol. 4, Handbook of Behavioral Neurobiology, Aschoff J. (ed.), Plenum Press, New York.

AURON P.E., WEBB A.C., ROSENWASSER L.J., MUCCI S.F., RICH A., WOLFF S.M. & DINARELLO C.A. (1984). Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 7907-7911.

AURON P.E. (1998). The Interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytok Growth Factor Rev* **9**: 221-237.

AZZI A., BOSCOBOINIK D. & HENSEY C. (1992). The protein kinase C family. *Eur J Biochem* **208**: 547-557.

BAE K., JIN X., MAYWOOD E.S., HASTINGS M.H., REPERT S.M. & WEAVER D.R. (2001). Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron* **30**: 525-536.

- BAEUERLE P. (1998). I κ B-NF- κ B structures: At the interface of inflammation control. *Cell* **95**: 729-731.
- BAGGIOLINI M. (2000). Reflections on chemokines. *Immunol Rev* **177**: 5-7.
- BAGRODIA S., DERIJARD B., DAVIS R.J. & CERIONE R.A. (1995). Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **270**: 27995-27998.
- BALSALOBRE A., DAMIOLA F. & SCHIBLER U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* **93**: 929-937.
- BALSALOBRE A., BROWN S.A., MARCACCI L., TRONCHE F., KELLENDONK C., REICHARDT H.M., SCHUTZ G. & SCHIBLER U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* **289**: 2344-2347.
- BALSALOBRE A. (2002). Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res* **309**: 193-199.
- BAUMANN H., ONORATO V., GAULDIE J. & JAHREIS G.P. (1987). Distinct sets of acute phase plasma proteins are stimulated by separate human hepatocyte-stimulating factors and monokines in rat hepatoma cells. *J Biol Chem* **262**: 9756-9768.
- BAZAN J.F. (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Nat Acad Sci USA* **87**: 6934-6938.
- BELL R.M. & BURNS D.J. (1991). Lipid activation of protein kinase C. *J Biol Chem* **266**: 4661-4664.
- BENBROOK D.M. & JONES N.C. (1994). Different binding specificities and transactivation of variant CRE's by CREB complexes. *Nucleic Acids Res* **22**: 1463-1469.
- BERRIDGE M.J. & IRVINE R.F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* **341**: 197-205.
- BIRNBOIM H.C. & DOLY J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- BONE-LARSON C.L., SIMPSON K.J., COLLETTI L.M., LUKACS N.W., CHEN S.C., LIRA S., KUNKEL S.L. & HOGABOAM CM. (2000). The role of chemokines in the immunopathology of the liver. *Immunol Rev* **177**: 8-20.
- BÖRSCH-HAUBOLD, A.G., PASQUET, S. & WATSON, S. (1998). Direct inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by kinase inhibitors SB 203580 and PD 98059. *J Biol Chem* **273** (44): 28766-28772.
- BOULTON T., ZHONG Z., WEN Z., DARNELL J.E., STAHL N. & YANCOPOULOS G.D. (1995). STAT3 activation by cytokines utilizing gp130 and related transducers involves a secondary modification requiring an H7-sensitive kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 6915-6919.
- BRUCE V.G. (1972). Mutants of the biological clock in *Chlamydomonas reinhardi*. *Genetics* **70**: 537-548.

- BUNGER M.K., WILSBACHER L.D., MORAN S.M., CLENDENIN C., RADCLIFFE L.A., HOGENESCH J.B., SIMON M.C., TAKAHASHI J.S. & BRADFIELD C.A. (2000). Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* **103**: 1009-1017.
- CANTLEY LC. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**: 1655-1657.
- CAO Z., HENZEL W.J. & GAO X. (1996). IRAK: a kinase associated with the Interleukin-1 receptor. *Science* **271**: 1128-1131.
- CHEDID M., SHIRAKAWA F., NAYLOR P. & MIZEL S.B. (1989). Signal transduction pathway for IL-1. *J Immunol* **142**: 4301-4306.
- CHEDID M. & MIZEL S.B. (1990). Involvement of cyclic AMP-dependent protein kinases in the signal transduction pathway for Interleukin-1. *Mol Cell Biol* **10**: 3824-3827.
- COLOTTA F., RE F., MUZIO M., BERTINI R., POLENTARUTTI N., SIRONI M., GIRI J.G., DOWER S.K., SIMS J.E. & MANTOVANI A. (1993). Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* **261**: 472-475.
- COLOTTA F., DOWER S.K., SIMS J.E. & MANTOVANI A. (1994). The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today* **15**: 562-566.
- COMMUNI D., DEWASTE V. & ERNEUX C. (1999). Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C-mediated phosphorylation and activation of D-myo-Inositol 1,4,5-Triphosphate 3-kinase B in astrocytes. *J Biol Chem* **274**: 14734-14742.
- COULIN F., POWER C.A., ALOUANI S., PEITSCH M.C., SCHROEDER J.M., MOSHIZUKI M., CLARLEWIS I. & WELLS T.N.C. (1997). Characterisation of macrophage inflammatory protein-5/human CC Zytokine-2, a member of the macrophage-inflammatory-protein family of chemokines. *Eur J Biochem* **248**: 507-515.
- CRESSMAN D.E., GREENBAUM L.E., DEANGELIS R.A., CILIBERTO G., FURTH E.E., POLI V. & TAUB R. (1996). Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* **274**: 1379-1383.
- CROSTON G.E., CAO Z. & GOEDDEL D.V. (1995). NF- κ B activation by interleukin-1 (IL-1) requires an IL-1 receptor associated protein kinase activity. *J Biol Chem* **270**: 16514-16517.
- DAMIOLA F., LE MINH N., PREITNER N., KORNMANN B., FLEURY-OLELA F. & SCHIBLER U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* **14**: 2950-2961.
- DARLINGTON T.K., WAGER-SMITH K., CERIANI M.F., STAKNIS D., GEKAKIS N., STEEVES T.D.L., WEITZ C.J., TAKAHASHI J.S. & KAY S.A. (1998). Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* **280**: 1599-1603.
- DARNELL J.E., KERR I. & STARK G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**: 1415-1421.

- DAY N.R., WALDER J.A. & MAURER A. (1989). A protein kinase inhibitor gene reduces both basal and multihormone-stimulated Prolactin gene transcription. *J Biol Chem* **264**: 431-436.
- DECKER K. (1990). Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* **192**: 245-261.
- DE GROOT R.P., DEN HERTOOG J., VANDENHEEDE J.R., GORIS J. & SASSONE-CORSI P. (1993). Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function. *EMBO J* **12**: 3903-3911.
- DEKKER L.V. & PARKER P.J. (1994). Protein kinase C: a question of specificity. *Trends Biochem Sci* **19**: 73-7.
- DELUCA D. & MIZEL S.B. (1986). I-A-positive nonlymphoid cells and T cell development in murine fetal thymus organ cultures: interleukin 1 circumvents the block in T cell differentiation induced by monoclonal anti-I-A antibodies. *J Immunol* **137**: 1435-1441.
- DETHEUX M., STANDKER L., VAKILI J., MUNCH J., FORSSMANN U., ADERMANN K., POHLMANN S., VASSART G., KIRCHHOFF F., PARMENTIER M. & FORSSMANN W.G. (2000). Natural proteolytic processing of hemofiltrate CC chemokine 1 generates a potent CC chemokine receptor (CCR)1 and CCR5 agonist with anti-HIV properties. *J Exp Med* **192**: 1501-1508.
- DINARELLO C.A. (1984). Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *N Engl J Med* **311**: 1413-1418.
- DINARELLO C.A. (1988). Biology of interleukin 1. *FASEB J* **2**: 108-115.
- DINARELLO C.A. (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* **77**: 1627-1652.
- DINARELLO C.A. (1996). Biologic basis for Interleukin-1 in disease. *Blood* **87**: 2095-2147.
- DUNLAP J.C. (1998). Common threads in eukaryotic circadian systems. *Curr Opin Genet Dev* **8**: 400-406.
- DUNLAP J.C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**: 271-290.
- ENG F.J. & FRIEDMAN S.L. (2000). Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**: G7-G11.
- FEDER LS, TODARO JA, LASKIN DL. (1993). Characterization of interleukin-1 and interleukin-6 production by hepatic endothelial cells and macrophages. *J Leukoc Biol* **53**: 126-132.
- FELDMAN J.F. & HOYLE M.N. (1973). Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* **75**: 605-613.
- FORSSMANN U., MÄGERT H.J., ADERMANN K., ESCHER S.E. & FORSMANN W.G. (2001). hemofiltrate CC chemokines with unique biochemical properties: HCC-1/CCL14a and HCC-2/CCL15. *J Leukoc Biol* **70**: 357-366.

- FRANKE T.F., YANG S., CHAN T.O., DATTA K., KAZLAUSKAS A., MORRISIN D.K., KAPLAN D.R. & TSICHLIS P.N. (1995). The protein kinase encoded by the *Akt* Proto-Oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* **81**: 727-736.
- FRUMAN D.A. & CANTLEY L.C. (2002). Phosphoinositide 3-kinase in immunological systems. *Semin Immunol* **14**: 7-18.
- FRY M.J. (1994). Structure, regulation and function of phosphoinositide 3-kinase. *Biochim Biophys Acta* **1226**: 237-268.
- 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.
- GARRINGTON T.P. & JOHNSON G.L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 211-218.
- GEER VAN DER P. & HUNTER T. (1994). Receptor protein-tyrosin kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* **10**: 251-337.
- GEKAKIS N., STAKNIS D., NGUYEN H.B., DAVIS F.C., WILSBACHER L.D., KING D.P., TAKAHASHI J.S. & WEITZ C.J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **280**: 1564-1569.
- GERHARTZ C., HESSEL B., SASSE J., HEMMANN U., LANDGRAF C., SCHNEIDER-MERGENER J., HORN F., HEINRICH P.C. & GRAEVE L. (1996). Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the Interleukin 6 signal transducer gp130. *J Biol Chem* **271**: 12991-12998.
- GERY I., GERSHON R.K. & WAKSMAN B.H. (1972). Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. *J Exp Med* **136**: 128-142.
- GILMAN A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann Rev Biochem* **56**: 615-649.
- GIRI J.G., KINCADE P.W. & MIZEL S.B. Interleukin 1-mediated induction of kappa-light chain synthesis and surface immunoglobulin expression on pre-B cells. *J Immunol* **132**: 223-228.
- GJERTSEN B.T., MELLGREN G., OTTEN A., MARONDE E., GENIESER H.G., JASTORFF B., VINTERMYR O.K., MCKNIGHT G.S. & DOSKELAND S. (1995). Novel (*Rp*)-cAMPS Analogs as tools for inhibition of cAMP-kinase in cell culture. *J Biol Chem* **270**: 20599-20607.
- GLOSSOP N.R., LYONS L.C. & HARDIN PE. (1999). Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator. *Science* **286**: 766-768.
- GREEN D.J. & GILLETTE R. (1982). Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res* **245**: 198-200.

- GREENFEDER S.A., NUNES P., KWEE L., LABOW M. & CHIZZONITE R.A. (1995). Molecular cloning and characterization of a second subunit of the Interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem* **270**: 13757-13765.
- GRIFFIN E.A., STAKNIS D. & WEITZ C.J. (1999). Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science* **286**: 768-771.
- GROOS G. & HENDRIKS J. (1982). Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neurosci Lett* **34**: 283-288.
- GSCHWENDT M., KITTSTEIN W. & MARKS F. (1993). Elongation factor-2 kinase: effective inhibition by the novel protein kinase inhibitor rottlerin and relative insensitivity towards staurosporine. *FEBS Lett* **338**: 85-88.
- HEINRICH P.C., BEHRMANN I., MÜLLER-NEWEN G., SCHAPER F. & GRAEVE L. (1998). Interleukin-6-type Zytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* **334**: 297-314.
- 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.
- HIRANO T. (1996). Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Intern Rev Immunol* **16**: 249-284.
- HOLMAN J.M. & JR. SABA T.M. (1988). Effect of bacterial sepsis on gluconeogenic capacity in the rat. *J Surg Res* **45**: 167-175.
- HORN F., HENZE C. & HEIDRICH K. (2000). Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function. *Immunobiol* **202**: 151-167.
- HOUSLAY M.D. & KOLCH W. (2000). Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol* **58**: 659-668.
- HOWARD P., DAY K.H., KIM K.E., RICHARDSON J., THOMAS J., ABRAHAM I., FLEISCHMANN R.D., GOTTESMAN M.M. & MAURER R.A. (1991). Decreased catalytic subunit mRNA levels and altered catalytic subunit mRNA structure in a cAMP-resistant Chinese Hamster Ovary cell line. *J Biol Chem* **266**: 10189-10195.
- HU Q., KLIPPEL A., MUSLIN A.J., FANTL W.J. & WILLIAMS L.T. (1995). *Science* **268**: 100-102.
- HUNTER T. & COOPER J.A. (1985). Protein-tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* **54**: 897-930.
- HUNTER T. (2000). Signaling – 2000 and beyond. *Cell* **100**: 113-127.
- INOUE S.T. & KAWAMURA H. (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci* **76**: 5962-5966-
- ISHIDA N., KANEKO M. & ALLADA R. (1999). Biological clocks. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8819-8820.
- JOHNSON G.L. & LAPADAT R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**: 1911-1912.

- KARIN M. & HUNTER T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* **5**: 747-757.
- KING D.P., ZHAO Y., SANGORAM A.M., WILSBACHER L.D., TANAKA M., ANTOCH M.P., STEEVES T.D.L., VITATERNA M.H., KORNHAUSER J.M., LOWREY P.L., TUREK F.W. & TAKAHASHI J.S. (1997). Positional cloning of the mouse circadian *clock* gene. *Cell* **89**: 641-653.
- KISHIMOTO T., TAGA T. & AKIRA S. (1994). Cytokine signal transduction. *Cell* **76**: 253-262.
- KLIPPEL A., REINHARD C., KAVANAUGH W.M., APELL G., ESCOBEDO M.A. & WILLIAMS L.T. (1996). Membrane localization of Phosphatidylinositol 3-Kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways. *Mol Cell Biol* **16**: 4117-4127.
- KNITTEL T., MÜLLER L., SAILE B. & RAMADORI G. (1997). Effect of tumor necrosis factor- α on proliferation, activation and protein synthesis of rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* **27**: 1067-1080.
- KNOLLE P.A. & GERKEN G. (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* **174**: 21-34.
- KORHERR C., HOFMEISTER R., WESCHE H. & FALK W. (1997). A critical role for interleukin-1 receptor accessory protein in interleukin-1 signaling. *Eur J Immunol* **27**: 262-267.
- KUNKEL S.L. (1999). Through the looking glass: the diverse in vivo activities of chemokines. *J Clin Invest* **104**: 1333-1334.
- KUME K., ZYLKA M.J., SRIRAM S., SHEARMAN L.P., WEAVER D.R., JIN X., MAYWOOD E.S., HASTINGS M.H. & REPPERT S.M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**: 193-205.
- LAPINSKI T.W. (2001). The level of IL-1 beta, IL-4 and IL-6 in the serum and the liver of chronic HCV-infected patients. *Arch Immunol Ther Exp* **49**: 311-316.
- LEE C., ETCHEGARAY J.P., CAGAMPANG F.R., LOUDON A.S. & REPPERT S.M. (2001). Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* **107**: 855-867.
- LIEBMANN C. (2001). Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal* **13**: 777-785.
- LILES W.C. & VAN VOORHIS W.C. (1995). Nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *J Infect Dis* **172**: 1573-1580.
- LINDL, T. (2000): Zell und Gewebekultur. 4. Überarbeitete Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.
- LIN Y-Z., YAO S.Y., VEACH R.A., TORGERSON T.R. & HAWIGER J. (1995). Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF- κ B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* **270**: 14255-14258.

- LODI P.J., GARRETT D.S., KUSZEWSKI J., TSANG M.L., WEATHERBEE J.A., LEONARD W.J., GRONENBORN A.M. & CLORE G.M. (1994). High-resolution solution structure of the beta chemokine hMIP-1 beta by multidimensional NMR. *Science* **263**: 1762-1767.
- LOMEDICO P.T., GUBLER U., HELLMANN C.P., DUKOVICH M., GIRI J.G., PAN Y.C., COLLIER K., SEMIONOW R., CHUA A.O. & MIZEL S.B. (1984). Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in Escherichia coli. *Nature* **312**: 58-62.
- LUSTER A.D. (1998). Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* **338**: 436-445.
- LÜTTICKEN C., WEGENKA U.M., YUAN J., BUSCHMANN J., SCHINDLER C., ZIEMIECKI A., HARPUR A.G., WILKS A.F., YASUKAWA K., TAGA T., KISHIMOTO T., BARBIERI G., PELLEGRINI S., SENDTNER M., HEINRICH P.C. & HORN F. (1994). Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the Interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* **263**: 89-92.
- MACKAY C.R. (2001). Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* **2**: 95-101.
- MAHER J.J., LOZIER J.S. & SCOTT M.K. (1998). Rat hepatic stellate cells produce cytokine-induced neutrophil chemoattractant in culture and in vivo. *Am J Physiol* **275**: G847-G853.
- MAHER J.J. (2001). Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Disease* **21**: 417-426.
- MALMROS C., HOLST E., HANSSON L., MARTENSSON L. & THORNE J. (1994). Dynamic accumulation of neutrophils in lungs and visceral organs during early abdominal sepsis in the pig. *World J Surg* **18**: 811-816.
- MANTOVANI A. (1999). The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* **20**: 254-257.
- MANTOVANI A. & SOZZANI S. (2000). Chemokines. The Zytokine Network, Oxford University Press.
- MARRA F., VALENTE AJ, PINZANI M, ABBOUD HE. (1993). Cultured human liver fat-storing cells produce monocyte chemotactic protein-1. Regulation by proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* **92**: 1674-1680.
- MARRA F., DEFRANCO R., GRAPPONE C., MILANI S., PASTACALDI S., PINZANI M. ROMANELLI R.G., LAFFI G. & GENTILINI P. (1998). Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 during active hepatic fibrogenesis. *Am J Pathol* **152**: 423-430.
- MARRA F. (1999). Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *J Hepatol* **31**: 1120-1130.
- MARRA F. (2002). Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front Biosci* **7**: 1899-1914.
- MEYERS J., SANCHEZ D., ELWELL L. & FALKOW S. (1976). Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* **127**: 1592-1537.

- MIYAJIMA A., KITAMURA T., HARADA N., YOKOTA T. & ARAI K. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol* **10**: 295-331.
- MOTZKUS D. & MARONDE E. (2003). Oscillation of human Period 1 (*hPER1*) reporter gene activity in human neuroblastoma cells *in vivo*. *Chronobiol. Int.* in Druck.
- MOTZKUS D., MARONDE E., GRUNENBERG U., LEE C.C., FORSSMANN W.G. & ALBRECHT U. (2000). The human *PER1* gene is transcriptionally regulated by multiple signaling pathways. *FEBS Lett* **486**: 315-319.
- MURPHY PM. (1994). The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* **12**: 593-633.
- MUZIO M., NI J., FENG P. & DIXIT V.M. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* **278**: 1612-1615.
- NEWTON A.C. (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* **270**: 28495-28498.
- NIGG E.A., HILZ H., EPPENBERGER H.M. & DUTLY F. (1985). Rapid and reversible translocation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase type II from the Golgi complex to the nucleus. *EMBO J* **11**: 2801-2806.
- NISHIZUKA Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**: 305-312.
- O'NEILL L.A.J. & GREENE C. (1998). Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* **63**: 650-657.
- O'NEILL L.A.J., BIRD T.A., GEARING A.J.H. & SAKLATVALA J. (1990). Interleukin-1 signal transduction. *J Biol Chem* **265**: 3146-3152.
- OBRIETAN K., IMPEY S., SMITH D., ATHOS J. & STORM D.R. (1999). Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Chem* **274**: 17748-17756.
- OLIVE M., KRYLOV D., ECHLIN D.R., GARDNER K., TAPAROWSKY E. & VINSON C. (1997). A dominant negative to Activation Protein-1 (AP-1) that abolishes DNA binding and inhibits oncogenesis. *J Biol Chem* **272**: 1856-18594.
- OLSON T.S. & LEY K. (2002). Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **283**: R7-R28.
- ONO K. & HAN J. (2000). The p38 signal transduction pathway activation and function. *Cell Signal* **12**: 1-13.
- OKAMURA H., YAMAGUCHI S. & YAGATI K. (2002). Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res* **309**: 47-56.
- ORR J.W. & NEWTON A.C. (1994). Intrapeptide regulation of protein kinase C. *J Biol Chem* **269**: 8383-8387.

- PARDIGOL A., FORSSMANN U., ZUCHT H.D., LOETSCHER P., SCHULZ-KNAPPE P., BAGGIOLINI M., FORSSMANN W.G. & MÄGERT H.J. (1998). HCC-2, a human chemokine: gene structure, expression pattern, and biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6308-6313.
- PIERCE J.W., SCHOENLEBER R., JESMOK G., BEST J., MOORE S.A., COLLINS T. & GERRITSEN M.E. (1997). Novel inhibitors of Zytokine-induced I_kB α phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects *in vivo*. *J Biol Chem* **272**: 21096-21103.
- PREMACH B.A. & SCHALL T.J. (1996). Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nature Med* **2**: 1174-1178.
- RAMADORI G., KNITTEL T. & SAILE B. (1998). Fibrosis and altered matrix synthesis. *Digestion* **59**: 372-375.
- RAMADORI G. & ARMBRUST T. (2001). Cytokines in the liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **13**: 777-784.
- REDDY S.A.G., HUANG J.H. & LIAO W.S.L. (1997). Phosphatidylinositol 3-Kinase in Interleukin 1 signaling. *J Biol Chem* **272**: 29167-29173.
- REPPERT S.M. & WEAVER D.R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* **63**: 647-676.
- ROENNEBERG T. & MERROW M. (2002). "What watch?...such much!" Complexity and evolution of circadian clocks. *Cell Tissue Res* **30**: 3-9.
- RODRIGUEZ-VICIANA P., WARNE P.H., DHAND R., VANHAESEBROECK B., GOUT I., FRY M.J., WATERFIELD M.D. & DOWNWARD J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of ras. *Nature* **370**: 527-532.
- RUSAK B. & ZUCKER I. (1979). Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev* **59**: 449-526.
- RUTILA J.E., SURI V., LE M., SO W.V., ROSBASH M. & HALL J.C. (1998). CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* **93**: 805-814.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. AND EHRLICH, H.A. (1988). Primer-detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487.
- SAILE B., MATTHES N., KNITTEL T. & RAMADORI G. (1999). Transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* **30**: 196-202.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual (2nd Edition). *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- SANADA K., HAYASHI Y., HARADA Y., OKANO T. & FUKADA Y. (2000). Role of circadian activation of Mitogen-Activated Protein Kinase in chick pineal clock oscillation. *J Neurosci* **20** : 986-991.

SANGORAM A.M., SAEZ L., ANTOCH M.P., GEKAKIS N., STAKNIS D., WHITELEY A., FRUECHTE E.M., VITATERNA M.H., SHIMOMURA K., KING D.P., YOUNG M.W., WEITZ C.J. & TAKAHASHI J.S. (1998). Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron* **21**: 1101-1113.

SCHINDLER & DARNELL (1995). JAK-STAT Pathway. *Annu Rev Biochem* **64**: 621-651.

SCHULZ-KNAPPE P., MAGERT H.J., DEWALD B., MEYER M., CETIN Y., KUBBIES M., TOMECZKOWSKI J., KIRCHHOFF K., RAIDA M. & ADERMANN K. (1996). HCC-1, a novel chemokine from human plasma. *J Exp Med* **183**: 295-299.

SCHWARTZ W.J. & GAINER H. (1977). Suprachiasmatic nucleus: use of ¹⁴C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science* **197**:1089-1091.

SCHWEDE F., MARONDE E., GENIESER H.G. & JASTORFF B. (2000).Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs. *Pharmacol Therap* **87**: 199-226.

SEHGAL A., ROTHENFLUH-HILFIKER A., HUNTER-ENSOR M., CHEN Y., MYERS M.P. & YOUNG M.W. (1995). Rhythmic expression of timeless: a basis for promoting circadian cycles in period gene autoregulation. *Science* **270**: 732-733.

SHAULIAN E. & KARIN M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biol* **4**: 131-136.

SHEARMAN L.P., SRIRAM S., WEAVER D.R., MAYWOOD E.S., CHAVES I., ZHENG B., KUME K., LEE C.C., VAN DER HORST G.T.J., HASTINGS M.H. & REPERT S.M. (2000). Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* **288**: 1013-1019.

SHENG M, MCFADDEN G, GREENBERG ME. (1990). Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* **4**:571-82.

SHI Y. & GAESTEL M. (2002). In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance. *Biol Chem* **383**: 1519-1536.

SHIRAKAWA F., YAMASHITA U., CHEDID M. & MIZEL S.B. (1988). Cyclic AMP-an intracellular second messenger for interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8201-8205.

SIMS J.E., GAYLE M.A., SLACK J.L., ALDERSON M.R., BIRD T.A., GIRI J.G., COLOTTA F., RE F., MANTOVANI A., SHANEBECK K., GRABSTEIN K.H. & DOWER S.K. (1993). Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 6155-6159.

SIMS J.E. & DOWER S.K. (1994). Interleukin-1 receptors. *Eur Cytokine Netw* **5**: 539-546.

SOZZANI S., BONECCHI R., D'AMICO G., LUINI W., BERNASCONI S., ALLAVENA P. & MANTOVANI A. (1998). Old and new chemokines. Pharmacological regulation of chemokine production and receptor expression: mini-review. *J Chemother* **10**: 142-145.

- SPRENGER H., KAUFMANN A., GARN H., LAHME B., GEMSA D. & GRESSNER A.M. (1999). Differential expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in transforming rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* **30**: 88-94.
- STAHL N., BOULTON T.G., FARRUGGELLA T., IP N.Y., DAVIS S., WITTHUHN B.A., QUELLE F.W., SILVENNOINEN O., BARBIERI G., PELLEGRINI S., IHLE J.N. & YANCOPOULOS (1994). Association and activation of Jak-Tyk kinases CNTF-LIF-OSM-IL-6 β receptor components. *Science* **263**: 92-95.
- STOKKAN K.A., YAMAZAKI S., TEI H., SAKAKI Y. & MENAKER M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* **291**: 490-493.
- SUN Z.S., ALBRECHT U., ZHUCHENKO O., BAILEY J., EICHELE G. UND LEE C.C. (1997). *RIGUI*, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila period* gene. *Cell* **90**: 1003-1011.
- TAGA T., HIBI M., HIRATA Y., YAMASAKI K., YASUKAWA K., MATSUDA T., HIRANO T. & KISHIMOTO T. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* **58**: 573-581.
- TAKAHASHI, J.S. (1995). Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci* **18**: 531-553.
- TANIGUCHI T. (1995). Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* **268**: 251-255.
- TEI H., OKAMURA H., SHIGEYOSHI Y., FUKUHARA C., OZAWA R., HIROSE M. & SAKAKI Y. (1997). Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila period* gene. *Nature* **389**: 512-516.
- TOKER A., MEYER M., REDDY K.K., FALCK J.R., ANEJA R., ANEJA S., PARRA A., BURNS D.J., BALLAS L.M. & CANTLEY L.C. (1994). Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P₂ and PtdIns-3,4,5-P₃. *J Biol Chem* **269**: 32358-32367.
- TRAVNICKOVA-BENDOVA Z., CERMAKIAN N., REPPERT S.M. & SASSONE-CORSI P. (2002). Bimodal regulation of *mPeriod* promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *PNAS* **99**: 7728-7733.
- TSUKADA J., WATERMAN W.R., KOYAMA Y., WEBB A.C. & AURON P.E. (1996). A novel STS-like factor mediates lipopolysaccharide, Interleukin 1 (IL-1), and IL-6 signaling recognizes a gamma Interferon activation site-like element in the *IL1B* Gene. *Mol Cell Biol* **16**: 2183-2194.
- VAN DER HORST G.T., MUIJTJENS M., KOBAYASHI K., TAKANO R., KANNO S., TAKAO M., DE WIT J., VERKERK A., EKER A.P., VAN LEENEN D., BUIJS R., BOOTSMA D., HOEIJMAKERS J.H. & YASUI A. (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* **398**: 557-558.
- VIELHABER E., EIDE E., RIVERS A., GAO Z.H., & VIRSHUP D.M. (2000). Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian Casein Kinase I ϵ . *Mol Cell Biol* **20**: 4888-4899.
- VITATERNA M.H., KING D.P., CHANG A.M., KORNHAUSER J.M., LOWREY P.L., McDONALD J.D., DOVE W.F., PINTO L.H., TUREK F.W. & TAKAHASHI J.S. (1994). Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* **264**: 719-725.

- VOGELSTEIN B. & D.GILLESPIE. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 615-619.
- WALTON K.M., REHFUSS R.P., CHRIVIA J.C., LOCHNER J.E. & GOODMAN R.H. (1992). A dominant repressor of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP)-regulated enhancer-binding protein activity inhibits the cAMP-mediated induction of the somatostatin promoter in vivo. *Mol Endocrinol* **6**: 647-655.
- WANG S.C., OHATA M., SCHRUMS L., RIPPE R.A. & TSUKAMOTO H. (1998). Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* **273**: 302-308.
- WESCHE H., KORHERR C., KRACHT M., FALK W., RESCH K. & MARTIN M.U. (1997). The Interleukin-1 Receptor Accessory Protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of Interleukin-1 Receptor-associated kinase (IRAK) and Stress-activated Protein Kinases (SAP Kinases). *J Biol Chem* **272**: 7727-7731.
- WOLLNIK F. & BIHLER S. (1996). Strain differences in the distribution of arginine-vasopressin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the suprachiasmatic nucleus of laboratory rats. *Brain Res* **724**: 191-199.
- YAMAGUCHI S., MITSUI S., YAN L., YAGITA K., MIYAKE S. & OKAMURA H. (2000). Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol* **20**: 4773-4781.
- YAMAZAKI S., NUMANO R., ABE M., HIDA A., TAKAHASHI R., UEDA M., BLOCK G.D., SAKAKI Y., MENAKER M. & TEI H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**: 682-685.
- YOUN B.S., ZHANG S.M., LEE E.K., PARK D.H., BROXMEYER H.E., MURPHY P.M., LOCATI M., PEASE J.E., KIM K.K., ANTAL K. & KWON B.S. (1997). Molecular cloning of leucotactin-1: a novel human β -chemokine, a chemoattractant for neutrophils, monocytes, and lymphocytes, and a potent agonist at CC chemokine receptors 1 and 3. *J Immunol* **159**: 5201-5205.
- ZAUBERMAN A., ZIPORI D., KRUPSKY M. & BEN-LEVY R. (1999). Stress activated protein kinase p38 is involved in IL-6 induced transcriptional activation of STAT3. *Oncogene* **18**: 3886-3893.
- ZHANG S., HAN J., SELLA M.A., CHERNOFF J., KNAUS U.G., ULEVITCH R.J. & BOKOCH G.M. (1995). Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem* **270**: 23934-23936.
- ZHONG Z., WEN Z. & DARNELL J.E. (1994) Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* **264**: 95-98.
- ZLOTNIK A. & YOSHIE O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**: 121-127.
- ZYLKA M.J., SHEARMAN L.P., WEAVER D.R. & REPERT S.M. (1998). Three *period* homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* **20**: 1103-1110.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μM	mikromolar
Abb.	Abbildung
AP-1	Activator Protein-1
ATCC	„American Type Culture Collection“
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
cDNA	komplementäre DNA
C/EBP	CAAT-Enhancer Binding Protein
CRE	cAMP Response Element
CREB	CRE-Binding Protein
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
ddH ₂ O	Aqua bidestillata
DepC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
DNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	96%iges Ethanol
et al.	et altera
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GITC	Guanidine Isothiocyanate
h	Stunde/n
HCl	Salzsäure
HRP	„Horse-Radish-Peroxidase“, Meerrettich-Peroxidase
IP ₃	Inositol (1,4,5)-Triphosphat
IL-1β	Interleukin-1 beta
IL-1RAcP	IL-1 Receptor-Associated Protein
IL-6	Interleukin-6
IRAK	IL-1 Receptor Associated Kinase
J	Joule
JAK	Janus Kinase
JNK	p54 Jun-NH ₂ -Terminal-Kinase
kb	Kilobase/n
kDa	Kilodalton
kzw	1000 Zellen pro Well
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	molar

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute/n
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger Ribonucleid acid (Ribonukleinsäure)
MyD88	Myeloid-Activated Protein Kinase
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF κ B	Nuclear Factor- κ B
nM	nanomolar
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„Phosphste Buffered Saline“ (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
pH	potentium hydrogenii
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
RLU	Relativ Light Unit
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
RNA	„Ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
Rp-8-CPT-cAMPS	Rp-8-(4-Chlorophenylthio)-Adenosin-3',5'-cyclic Monophosphorthionat
Rpm	rounds per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SH2	src-Homologie Domäne
Sp-5,6-DCI-cBiMPS	5,6-Dichlorbenzimidazol-1- β -D-Ribofuranosyl-3',5'-Mono-Phosphorthionat
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Tab.	Tabelle
TNF	Tumor Necrosis Favior
UV	ultraviolett
üN	über Nacht
Vol.	Volumen

Zur Abkürzung von Aminosäuren wurde sowohl die Einbuchstaben- als auch die Dreibuchstaben-Nomenklatur verwendet

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde. Zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen habe ich vollständig angegeben. Ich versichere ferner, daß die Dissertation nicht schon als Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Sabine Loumi

Hannover, 30.04.03

Danksagung

Prof. Dr. Dr. Wolf-Georg Forssmann möchte ich für die sehr guten Arbeitsbedingungen sowie für die Möglichkeit danken, diese Arbeit in den Forschungslaboren der IPF PharmaCeuticals GmbH anfertigen zu können.

Für die Übernahme des Referates möchte ich Prof. Dr. Walter Müller vom Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover recht herzlich danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei PD.Dr. Erik Maronde und Dr. Dirk Motzkus für die gute Betreuung, sowie die engagierte und motivierende Unterstützung bei der Planung und Realisierung der Experimente bedanken. Herrn PD.Dr. Erik Maronde möchte ich zudem für die freundliche Übernahme des Korreferates danken.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche, kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich über die gesamte Promotionszeit unterstützt haben, für mich jederzeit da waren, und mich mit kreativen Postkarten, kleinen Überraschungen und Heller-Pralinen versorgt haben.

Auch allen meinen Freunden möchte ich danken, die mich während der Promotion begleitet haben, und mir in dieser Zeit Kraft und Inspiration für den Laboralltag gegeben haben.

Publikationsliste

Abstracta und Posterbeiträge:

Sabine Loumi, Erik Maronde, Wolf-Georg Forssmann and Dirk Motzkus (2000). A possible role of the human chemokine HCC-2 in inflammation, International Symposium NF κ B: regulation, Gen expression & Disease, Gent, Belgium, July 2001.

Lebenslauf

Name: Sabine Loumi

Anschrift: Friesenstraße 42
30161 Hannover

Geburtsdatum: 13.07.1970

Geburtsort: Frankfurt am Main

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1977 – 1981 Grundschole Nord Oberursel
1981 – 1990 Gymnasium Oberursel

Studium:

1990 – 1993 Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg Universität Mainz
Abschluß Vordiplom

1993 – 1996 Abschluß des Studiums mit dem Hochschulgrad Diplom-Biologin
an der Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main
(Note: "sehr gut")

Beruflicher Werdegang:

01/1997 – 10/1997 Teilnahme an dem Kurs "TQEM" der TÜV-Akademie
Rheinland Pfalz

10/1997 – 09/1998 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Ambulanten Herzzentrum
Frankfurt am Main

09/1998 – 10/1999 Anwendungsberaterin bei der Softwarefirma SMS Dataplan
GmbH & Co.KG Eschborn

03/2000 – 07/2000 Wissenschaftliche Assistentin im Fraunhofer Institut für Toxikologie
und Aerosolforschung Hannover

07/2000 Beginn der experimentellen Arbeiten zur Doktorarbeit am
IPF PharmaCeuticals GmbH, Leiter: Prof.Dr.Dr. Wolf-Georg
Forssmann