

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger

Molekulare Mechanismen der Gallensäuren-induzierten Inhibition

des Interleukin-6-Signalweges in der Leber

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Anna Caroline Kohlmann

2008

Als Inauguraldissertation gedruckt  
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:           Universitätsprofessor Dr. med. Joachim Windolf  
                  Dekan

Referent:      Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger

Korreferent:  Universitätsprofessor Dr. med. Rainer Haas

Meiner Mutter in Dankbarkeit,

im Gedenken an meinen Vater ( † 31.10.2005)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	
1.1	Gallensäuren	1
1.1.1	Biochemische Grundlagen und physiologische Relevanz von Gallensäuren	1
1.1.2	Gallensäuren-induzierte Signaltransduktion	3
1.2	Apoptose	5
1.2.1	Molekulare Mechanismen der Apoptose – Todesrezeptor–abhängige und –unabhängige Apoptose	5
1.2.2	Gallensäuren-induzierte Apoptose	7
1.3	Interleukin-6	9
1.3.1	Signaltransduktion und physiologische Relevanz	9
1.3.2	Crosstalk des IL-6-Signalweges	15
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	
3.1	Leberperfusion	17
3.2	Isolation von primären Rattenhepatozyten und Zellkultur	17
3.3	Proteinbestimmung	18
3.4	Westernblot	19
3.5	Real Time PCR	20

3.6	Statistik	20
3.7	Materialien	22
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	
4.1	Modulation der gp130-Proteinexpression durch Gallensäuren	26
4.1.1	Effekte von Gallensäuren auf die gp130-Proteinexpression in primären Rattenhepatozyten und NTCP-transfezierten HepG2-Zellen	26
4.1.2	Effekte von GCDC auf die gp130-Proteinexpression in der perfundierten Rattenleber	29
4.1.3	Rolle des Proteasoms bzw. Lysosoms für die GCDC-induzierte gp130-Degradation	30
4.1.4	Rolle der Caspasen für die GCDC-induzierte gp130-Downregulation	33
4.2	Modulation der IL-6-induzierten STAT-Phosphorylierung durch Gallensäuren	35
4.2.1	Effekte von GCDC auf die Phosphorylierung der STAT-Proteine in primären Rattenhepatozyten und NTCP-transfezierten HepG2-Zellen	35
4.2.2	Molekulare Mechanismen der GCDC-induzierten Hemmung der STAT3-Phosphorylierung	40
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	
5.1	Modulation des IL-6-Signalweges durch Gallensäuren	43
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	49

## **Literatur, Anhang**

# Abkürzungen

$\alpha_2$ M	$\alpha_2$ -Makroglobulin
Apaf	Apoptose-Protease aktivierender Faktor
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
Bid	“Bcl-2-interacting protein”
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsep	“bile salt export pump”
cAMP	Adenosin-3`, 5`-monophosphat
Caspase	Cystein-abhängige Aspartat-schneidende Protease
cDNA	“complementary DNA”
C/EBP	“CCAAT enhancer binding protein“
CIS	“cytokine inducible SH2 protein”
CLC	“cardiotrophin-like cytokine”
CNTF	“ciliary neurothrophic factor”
CREB	CRE-bindendes Protein
CT-1	“cardiotrophin-1”
DCC	“deleted in colorectal cancer”
DISC	“death-inducing signalling complex”
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	“enhanced chemiluminescence”
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	“epidermal growth factor”
EGFP	“enhanced green fluorescent protein”
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
Erk	“extracellular signal-regulated kinase”
FADD	“fas associated death domain”
FAK	“focal adhesion kinase”
FCS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCDC	Glykochenodeoxycholsäure
gp130	Glykoprotein 130
Grb-SOS	“growth factor receptor bound protein/Son of Sevenless”
IL-6	Interleukin-6
JAB	“Jak-binding protein“
Jak	Janus-Kinase
JNK	“c-Jun N-terminal kinase“
KIR	“kinase inhibitory region”
LIF	“leukemia inhibiting factor”
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	“mitogen-activated protein kinase”
MEK	“mitogen-activated protein kinase/Erk-Kinase“
MEM	“minimal essential medium”
mRNA	“messenger RNA”
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NNT-1/BCF3	“novel neurotrophin-1/B cell stimulating factor-3”
NO	Stickstoffmonoxid

NRTK	Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase
NTC	“non-template-control”
NTCP	“Na <sup>+</sup> /taurocholate cotransporting protein”
OSM	“oncostatin M”
PARP	Poly (ADP-Ribose)-Polymerase
PIAS	“protein inhibitors of activated STATs”
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
RET	“rearranged during transfection”
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	“Src-homology”
SHP2	“SH2-domain-containing tyrosine phosphatase”
SOCS	“suppressor of cytokine signalling”
SSI	“STAT-inducible STAT inhibitor”
STAT	“signal transducer and activator of transcription”
TBST	“Tris-buffered saline tween”
TC	Taurocholsäure
TCDC	Taurochenodeoxycholsäure
TIMP	“tissue inhibitor of metalloproteinase”
TLCS	Taurolithocholsäure-3-sulfat
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	“TNF-R associated death domain”
TRAIL	“TNF-related apoptosis-inducing ligand”
TRAMP	“TNF-receptor-related apoptosis protein”
TUDC	Tauroursodeoxycholsäure

Die dieser Dissertationsschrift zugrundeliegenden Daten gelangten in folgenden Präsentationen zur Darstellung:

*Originalarbeit*

Graf D, Kohlmann C, Haselow K, Gehrman T, Bode JG, Häussinger D.

Bile acids inhibit interleukin-6 signaling via gp130 receptor-dependent and -independent pathways in rat liver.

*Hepatology 44: 1206-1217, 2006.*

*Poster*

Haselow K, Münks I, Kohlmann C, Bode JG, Häussinger D, Graf D.

Caspase 3-vermittelte Inhibition des IL-6-Signalweges.

*Posterpreis auf der Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber in Göttingen, 26./27.01.2007*

# 1. Einleitung

## 1.1 Gallensäuren

### 1.1.1 Biochemische Grundlagen und physiologische Relevanz von Gallensäuren

In Leber, Galle und Darm aller Säugetiere erfüllen Gallensäuren eine Reihe wichtiger physiologischer Funktionen, die insbesondere für den Lipidstoffwechsel von Bedeutung sind (16;47). Die Gallensäuren der Wirbeltiere gehören zur Stoffklasse der Steroide und sind die quantitativ wichtigsten Metabolite von Cholesterin. Zusammen mit Lecithin spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Ausscheidung von freiem Cholesterin aus der Leber. In Galle und Darmlumen sind Gallensäuren sehr wichtige physiologische Emulgatoren, da sie Cholesterin und Phospholipide in makromolekularen Aggregaten, den gemischten Mizellen und unilamellaren Vesikeln, solubilisieren.

Im Darm haben Gallensäuren spezifische Effekte auf eine Reihe von Lipasen. Einige dieser lipolytischen Enzyme weisen eine Abhängigkeit ihrer Aktivität in Anwesenheit von Gallensäuren auf; weiterhin schützen Gallensäuren die Lipasen gegen proteolytische Verdauung und Oberflächendenaturierung. Bei der Fettverdauung besteht die entscheidende Bedeutung der Gallensäuren darin, dass sie für die Lipase-Colipase-Systeme Substratoberflächen zugänglich machen.

Durch Bildung von gemischten Mizellen werden die Produkte der Lipolyse und andere wichtige Lipide wie Cholesterin, Lipovitamine und hydrophobe Pharmaka mit Gallensäuren solubilisiert und schließlich durch die Enterozyten resorbiert.

Als physiologische Detergentien sind Gallensäuren amphiphatische Verbindungen; ihre chemische Struktur weist sowohl hydrophobe (Steroidkern und Methylgruppen) als auch hydrophile (Carboxyl- und Hydroxylgruppen) Elemente auf. Die Biosynthese der Gallensäuren findet ausschließlich in der Leber statt. Ausgehend vom Cholesterin werden in Hepatozyten höherer Wirbeltiere durch Hinzufügen einer Carboxylgruppe sowie von Hydroxylgruppen die primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodeoxycholsäure gebildet. In vivo werden die unkonjugierten Derivate der Gallensäuren mit Glycin oder Taurin

konjugiert, wodurch sie wasserlöslicher werden. Nach Exkretion der Gallensäuren in die Galleflüssigkeit gelangen sie über die ableitenden Gallenwege entweder unmittelbar oder mittelbar über die Gallenblase ins Duodenum. Die primären Gallensäuren können im Intestinum von anaeroben Bakterien metabolisiert und dabei dehydroxyliert und dekonjugiert werden, wodurch die hydrophoben sekundären Gallensäuren Lithocholsäure und Deoxycholsäure entstehen, welche wiederum teilweise reabsorbiert werden. Die hepatischen oder intestinalen Metaboliten der sekundären Gallensäuren werden als tertiäre Gallensäuren bezeichnet. Lithocholsäure wird bakteriell über die Zwischenstufe Ketolithocholsäure in eine tertiäre Gallensäure, die Ursodeoxycholsäure, umgewandelt. Die Ursodeoxycholsäure unterscheidet sich von der Chenodeoxycholsäure nur in der Anordnung der 7 $\beta$ -Hydroxylgruppe, wodurch sie hydrophile Eigenschaften erhält. Das Mengenverhältnis Chenodeoxycholsäure zu Cholsäure und Deoxycholsäure beträgt 2:2:1; Lithocholsäure und Ursodeoxycholsäure machen nur einen sehr geringen Teil des Gesamtpools der Gallensäuren aus.

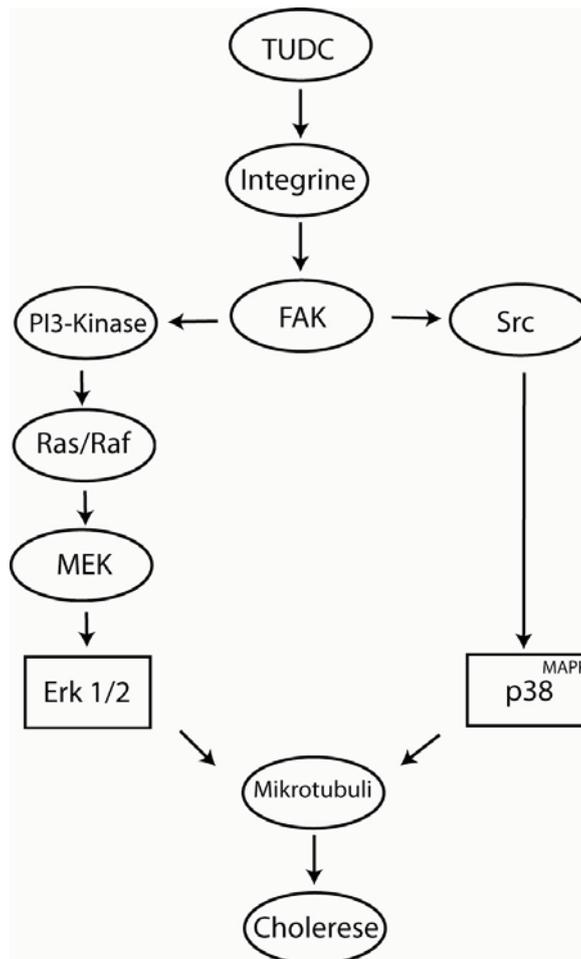
Über 90 % der sezernierten Gallensäuren werden nach Erfüllung der Funktion bei der Fettverdauung vor allem im terminalen Ileum durch aktiven Transport und passive Diffusion resorbiert (enterohepatischer Kreislauf). Zur Leber werden alle resorbierten Gallensäuren über das Pfortaderblut zurückgeführt, entweder an Albumin gebunden oder in Lipoproteine eingebaut. Während einer Leberpassage werden 60-80 % der Gallensäuren von den Hepatozyten aufgenommen. Die Gallensäuren werden rekonjugiert sowie ein Teil der sekundären Gallensäuren rehydroxyliert. Danach gelangen sie zur erneuten Verwendung wieder in die Gallenblase. Der über den Stuhl ausgeschiedene Teil der Gallensäuren wird neu synthetisiert.

Unter pathophysiologischen Bedingungen, insbesondere im Rahmen cholestatischer Syndrome, wie der primär biliären Zirrhose bzw. akuter oder chronischer Virushepatitiden oder einer Obstruktion der Gallenwege, führt die Akkumulation hydrophober Gallensäuren zu einer hepatozellulären Schädigung. Auch soll der im Rahmen einer Cholestase auftretende Juckreiz durch Gallensäuren bedingt sein (8;43;94).

### 1.1.2 Gallensäuren-induzierte Signaltransduktion

Hydrophile Gallensäuren besitzen einen eher protektiven Charakter, während hydrophobe Gallensäuren eher toxisch wirken. Sie unterscheiden sich bezüglich ihrer Signaltransduktion und in ihrer Funktion im Hinblick auf Cholerese und Apoptose.

Eine Steigerung der aktiven Exkretion von Gallebestandteilen (Cholerese) wird durch die hydrophile Gallensäure TUDC (Tauroursodeoxycholsäure) induziert, indem die Aktivierung hepatozellulärer Signaltransduktionswege eine Steigerung der kanalikulären Transportkapazität vermittelt. Die Induktion der Cholerese beinhaltet ein komplexes Netzwerk von Signalkaskaden, an denen MAP (mitogen-activated protein)-Kinasen vom Erk (extracellular signal-regulated kinase)- und  $p38^{\text{MAPK}}$ -Typ beteiligt sind (35;60;61;85) (siehe Abbildung 1). Diese beiden Schaltstellen stellen voneinander unabhängige Signaltransduktionswege dar; für die choleretische Wirkung unter TUDC wird die Aktivierung beider Kinasen benötigt, denn bereits Blockade einer dieser Kinasen durch pharmakologische Substanzen führt zur Inhibition der Cholerese. Der transienten MAP-Kinasen-Aktivierung, die durch Phosphorylierung derselbigen geschieht, gehen mehrere Schritte voraus. Sowohl an der TUDC-induzierten Erk1/2- und  $p38^{\text{MAPK}}$ -Aktivierung, als auch an der TUDC-vermittelten Cholerese ist das Integrinsystem beteiligt. Stimulation der Integrine resultiert in einer Tyrosin-Autophosphorylierung der FAK (focal adhesion kinase). Der Weg zur Aktivierung der  $p38^{\text{MAPK}}$  führt nun weiter über die Stimulation der Src-Kinase, indem die SH2 (Src homology)-Domäne der Src-Kinase an FAK bindet und aktiviert wird. Der Phosphorylierung von Erk 1/2 geht eine FAK-abhängige Aktivierung der PI3-Kinase (Phosphatidylinositol 3-Kinase) voraus. Im Anschluss erfolgt dann eine Aktivierung von Erk 1/2 via des Ras-Raf-MEK-Signalweges. Auch die PKB (Proteinkinase B), die häufig unterhalb der PI3-Kinase lokalisiert ist, wird durch TUDC aktiviert. An der kanalikulären Membran findet schließlich ein MAPK-abhängiger Einbau des Bsep (Bile salt export pump) statt. Für die Rekrutierung des subkanalikulär lokalisierten Bsep wird neben der Aktivierung beider Kinasen (Erk1/2 und  $p38^{\text{MAPK}}$ ) auch die Modulation des Mikrotubulsystems unterhalb der MAP-Kinasen benötigt (35;36;60;61;85).



**Abbildung 1: TUDC-induzierte Signaltransduktion und Gallensäuren-Exkretion in der Leber**

TUDC aktiviert via der Integrine die FAK, welche wiederum Src bzw. die PI3-Kinase aktiviert. Schließlich erfolgt die Aktivierung der MAPK und eine Induktion der Choleresese (nähere Erläuterungen siehe Text). Modifiziert nach Häussinger (35).

Hydrophobe Gallensäuren wie die GCDC (Glykochenodeoxycholsäure) oder TLCS (Tauroolithocholsäure-3-sulfat) können eine Apoptose induzieren. Auf die Apoptose induzierenden Mechanismen in Gegenwart hydrophober Gallensäuren wird in 1.2.2 eingegangen.

TUDC spielt neben cAMP (Adenosin-3', 5'-monophosphat) auch eine Rolle bei der Inhibition der durch Gallensäuren-induzierten Apoptose. Durch beide Substanzen wird die durch GCDC- oder TLCS-induzierte lang anhaltende, für die Apoptose der Zelle wichtige, JNK (c-Jun N-terminal kinase)-Aktivierung in eine transiente Aktivierung umgewandelt. Weiterhin wird die Gallensäuren-induzierte CD95-Rezeptoraktivierung blockiert, indem die EGF-R (epidermal growth factor-Rezeptor)-Phosphorylierung durch TUDC/cAMP inhibiert und eine

Phosphorylierung des CD95-Rezeptors im Bereich von Serin- und Threoninresten hervorgerufen wird (33;34;77;79). TUDC hemmt außerdem die für die Induktion der Apoptose essentielle ROS (Reaktive Sauerstoffspezies)-Generierung durch hydrophobe Gallensäuren, sowie die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C (80;81).

Für die Apoptoseinhibition spielen die durch TUDC aktivierten MAP-Kinasen keine besondere Rolle, da weder die Inhibition der Erks noch der p38<sup>MAPK</sup> den protektiven TUDC-Effekt gegenüber der TLCS-vermittelten Apoptose aufheben kann. So vermitteln unterschiedliche Signaltransduktionswege den choleretischen Effekt von TUDC einerseits und den antiapoptotischen Effekt andererseits (33;61;85).

## **1.2 Apoptose**

### **1.2.1 Molekulare Mechanismen der Apoptose – Todesrezeptor-abhängige und –unabhängige Apoptose**

Die Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, dient unter physiologischen Umständen der Erhaltung einer Homöostase, indem überschüssige oder funktionell fehlerhafte Zellen eliminiert werden (55). Im Rahmen der Apoptose erfolgt die Aktivierung von Caspasen (Cystein-abhängige Aspartat-schneidende Proteasen), die als inaktive Vorstufen (Pro-Caspasen) intrazellulär synthetisiert und durch proteolytische Spaltung (Cleavage) aktiviert werden. Die Abspaltung der Prodomäne kann durch gegenseitige Spaltung nach Bildung eines Dimers aus zwei Pro-Caspasen erfolgen. Dadurch aktivierte Caspasen können sowohl sich selbst als auch andere Caspasen spalten und bilden so einen sich positiv verstärkenden Mechanismus. Caspasen sind eine der wenigen Proteasen, die in der lebenden Zelle nicht auf Kompartimente beschränkt sind, sondern frei im Zytoplasma vorkommen (11;23;64).

Für die Auslösung der Apoptose existieren zwei Hauptmechanismen (84;95), die beide zur Aktivierung von Caspasen führen: die Rezeptor-Liganden-Interaktion über sog. Todesrezeptoren und die direkte Schädigung der Mitochondrien (siehe Abbildung 2).

Durch Bindung zugehöriger Liganden an Todesrezeptoren in der Zellmembran, die der Familie der TNF (Tumornekrosefaktor)-Rezeptoren angehören, kann eine Apoptose ausgelöst

werden. Zur Zeit sind folgende fünf Todesrezeptoren bekannt: TNF-Rezeptor 1, CD95 (Fas/APO-1)-Rezeptor, der TRAMP (TNF-receptor-related apoptosis protein)-Rezeptor und der TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)-Rezeptor-1 bzw. -2. Bei dem CD95 und TNF-R<sub>1</sub> z.B. führt die Interaktion mit ihren Liganden CD95L und TNF $\alpha$  zur Oligomerisierung gleichartiger Rezeptormoleküle und zur Anbindung eines intrazytoplasmatischen Adaptermoleküls (fas associated death domain [FADD] bzw. TNF-R associated death domain [TRADD]) an die Todesdomäne des Rezeptors. An FADD bzw. TRADD werden wiederum mehrere Pro-Caspase 8- und/oder Pro-Caspase 10-Moleküle angelagert. Die gesamte Formation aus Todesrezeptoren, Adaptormolekülen und Pro-Caspasen 8 bzw. 10 wird als DISC (death-inducing signalling complex) bezeichnet. Die enge Zusammenlagerung der Pro-Caspasen innerhalb des DISC ermöglicht ihre Dimerisierung und damit Aktivierung (11). Bei sog. Typ-I Zellen führen die aktivierten Initiatorcaspasen 8 und 10 direkt zur Aktivierung der Effektorcaspasen (gemeinsame Endstrecke der beiden Apoptosewege s.u.). Bei Typ-II Zellen benötigt das Rezeptor-induzierte Apoptosesignal eine Amplifikation über den mitochondrialen Signaltransduktionsweg (84). In diesem Fall führt die Caspase 8 zur proteolytischen Spaltung von Bid (Bcl-2-interacting protein), einem Mitglied der Bcl 2-Familie, in tBid, das zu den Mitochondrien transloziert und dort eine Cytochrom C-Freisetzung induziert.

Der mitochondriale Apoptoseweg wird jedoch hauptsächlich durch direkte Einwirkung von zytotoxischen Substanzen auf die Mitochondrien aktiviert. Hier zu nennen sind Chemikalien, Zytostatika und DNA-Schäden infolge Bestrahlung oder Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53. Proapoptotische Proteine, wie Bax und Bak, oder erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel, NO (Stickstoffmonoxid) und ROS erzielen ihre Wirkung auch über Schädigung des Mitochondriums infolge einer Erhöhung der Membranpermeabilität. Entscheidend ist nach Membranschädigung die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytoplasma, wo es an den Apaf-1 (Apoptose-Protease aktivierender Faktor) und ATP (Adenosin-5'-triphosphat) bindet. Dieser Komplex lagert sich mit Monomeren der Pro-Caspase 9 zusammen und es entsteht das sog. Apoptosom. In seinem Mikromilieu dimerisieren die Pro-Caspase 9-Monomere zu aktiven Caspase 9-Molekülen (11;23;41).

Durch die aktivierten Initiatorcaspasen 8, 9 und 10 werden die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 proteolytisch aktiviert. Die Effektor-Caspasen liegen bereits als (inaktive) Dimere vor und gehen nach proteolytischer Spaltung ihrer Verbindungseinheit in aktive Dimere über. Über eine positive Rückkopplung können über Caspase 6 weitere Einheiten von Caspase 8 aktiviert

werden, ebenso gilt dies für die Caspase 7 hinsichtlich der Caspase 9. Die aktivierten Effektor-Caspasen führen zum Stop der Proteintranslation durch Zerstörung wichtiger Transkriptionsfaktoren und spalten strategisch wichtige zelluläre Bestandteile wie Proteine von Zytoskelett oder Kernstruktur, Enzyme mit Zellreparaturaufgaben, zellzyklusregulierende Moleküle sowie Moleküle oder Enzyme, die an Apoptoseablauf und -regulation selbst beteiligt sind (11;23;28;41). Die dadurch angestoßenen Reaktionen führen schließlich zu Zellschrumpfung, Kondensation des Zellkerns, DNA-Fragmentierung und Bildung von apoptotischen Bläschen/Körperchen (blebs/bodies). Diese morphologischen Veränderungen der Zelle unterscheidet die Apoptose grundlegend von anderen Formen des Zelltodes, wie z.B. der Nekrose. Zur Erkennung durch phagozytierende Zellen führt, neben anderen z.T. apoptotisch veränderten Oberflächenmolekülen, schon sehr früh in der Apoptose die Umverteilung des Phospholipids Phosphatidyl-Serin von der Innen- auf die Außenseite der Zellmembran (26).

### **1.2.2 Gallensäuren-induzierte Apoptose**

Gallensäuren können in hohen Konzentrationen aufgrund ihrer Wirkung als Detergentien direkt eine Zerstörung der Zellmembran hervorrufen, in geringeren Serumkonzentrationen induzieren hydrophobe Gallensäuren jedoch eine Apoptose (27;33;59;76;77;101).

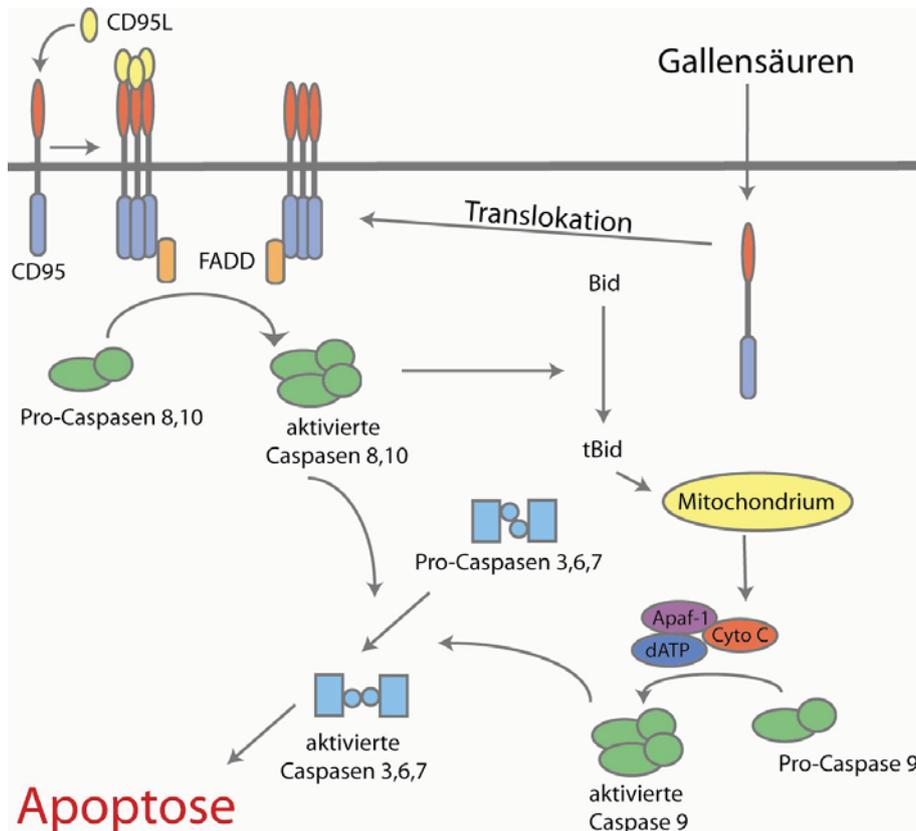
Die Gallensäuren TLCS und GCDC induzieren Apoptose über eine Aktivierung der Caspasen 3, 8 und 9, der eine Liganden-unabhängige CD95-Rezeptoraktivierung vorausgeht. Die Aktivierung des Rezeptors geschieht in Gegenwart der Gallensäuren über eine Translokation des CD95 zur Plasmamembran, an der eine hohe Rezeptordichte zu Oligomerisierung und Aktivierung der Rezeptoren führt (27;33;43;76;77). Der weitere Ablauf folgt dem Muster der Liganden-abhängigen Apoptose in Typ II-Zellen (1.2.1) (siehe Abbildung 2). Auch resultiert die erhöhte Dichte der Rezeptoren an der Membran in einer Sensibilisierung der Zellen für den Liganden-induzierten Zelltod.

Die Translokation des CD95 an die Plasmamembran umfasst mehrere Zwischenschritte (76;77). Nach Stimulation mit hydrophoben Gallensäuren kommt es zur Aktivierung einer sauren Sphingomyelinase, die zu einer Erhöhung des intrazellulären Ceramidgehaltes führt. Die durch Ceramide aktivierte PKC  $\zeta$  (Proteinkinase C) phosphoryliert die regulatorische p47<sup>phox</sup>-Untereinheit der NADPH (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat)-Oxidase an Serinresten, was zu deren Aktivierung führt (76;77;79). Im Folgenden kommt es zur

Selbstorganisation der NADPH-Oxidase durch Anlagerung weiterer Untereinheiten an die p47<sup>phox</sup> und zur Bildung von ROS. Es folgt die Aktivierung der Src-Familien-Kinase Yes, am ehesten durch Hemmung einer Phosphatase, sowie die lang anhaltende Aktivierung der JNK1/2 (33;76). Die aktivierte Yes-Kinase assoziiert mit dem EGF-R und aktiviert diesen durch Tyrosinphosphorylierung, bevor beide Proteine wieder dissoziieren. JNK-vermittelt bildet der aktivierte EGF-R dann mit dem CD95 ein Heterodimer und phosphoryliert diesen an Tyrosinresten, wobei die Phosphorylierung der beiden Tyrosinreste innerhalb der CD95-Todesdomäne (Tyr<sup>232</sup> und Tyr<sup>291</sup>) notwendige Bedingung für die Mikrotubuli-abhängige Membrantranslokation des CD95/EGF-R-Proteinkomplexes und die anschließende Bildung des DISC ist (33;76;77;79).

Die dadurch aktivierte Initiator-Caspase 8 spaltet Bid, das zum Mitochondrium transloziert, wodurch Cytochrom C und Apaf freigesetzt werden. Dies führt zur Aktivierung der downstream liegenden Caspasen 9 und 3. Auch wird auf Ebene der Mitochondrien das ROS-Signal in Anwesenheit von Gallensäuren verstärkt (76). Die mitochondriale Amplifikation des Apoptosesignals führt schließlich zur Apoptose.

Neben der Translokation des CD95 an die Plasmamembran induzieren Gallensäuren auch eine vermehrte Expression des TRAIL2-Rezeptors und die Suppression von cFLIP, einem antiapoptotischen Protein, das über die Modulation des Todesrezeptors wirkt; auch eine direkte Toxizität der Gallensäuren auf die Mitochondrien führt zu einer Verstärkung der apoptotischen Signalkaskade (34;43;80;81).



**Abbildung 2: Toxische Gallensäuren führen zu einer Todesrezeptor-vermittelten, Liganden-unabhängigen Apoptose**

Bindung von Liganden an Todesrezeptoren (z.B. CD95) löst eine Apoptose über Aktivierung von Caspasen aus. Die Liganden-unabhängig vermittelte Oligomerisation des Rezeptors in Anwesenheit von Gallensäuren induziert ebenfalls den Caspase-abhängigen Zelltod (nähere Erklärungen siehe Text). Modifiziert nach Higuchi (43).

## 1.3 Interleukin-6

### 1.3.1 Signaltransduktion und physiologische Relevanz

IL-6 (Interleukin-6) besitzt ein Molekulargewicht von 26 kDa und besteht aus 184 Aminosäuren. Es ist ein pleiotrop wirkendes Zytokin, das von einer Vielzahl verschiedener Zellen wie z.B. Monozyten/Makrophagen, Kupffer-Zellen, Neutrophilen, Mastzellen, B- und T-Zellen, Endothelzellen oder Fibroblasten sezerniert wird. Die IL-6-Produktion wird durch

Endotoxine, Sauerstoffradikale, Wachstumsfaktoren und Änderungen des Redoxstatus des Zellmilieus induziert, was wiederum zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und der Expression von IL-6 führt (29).

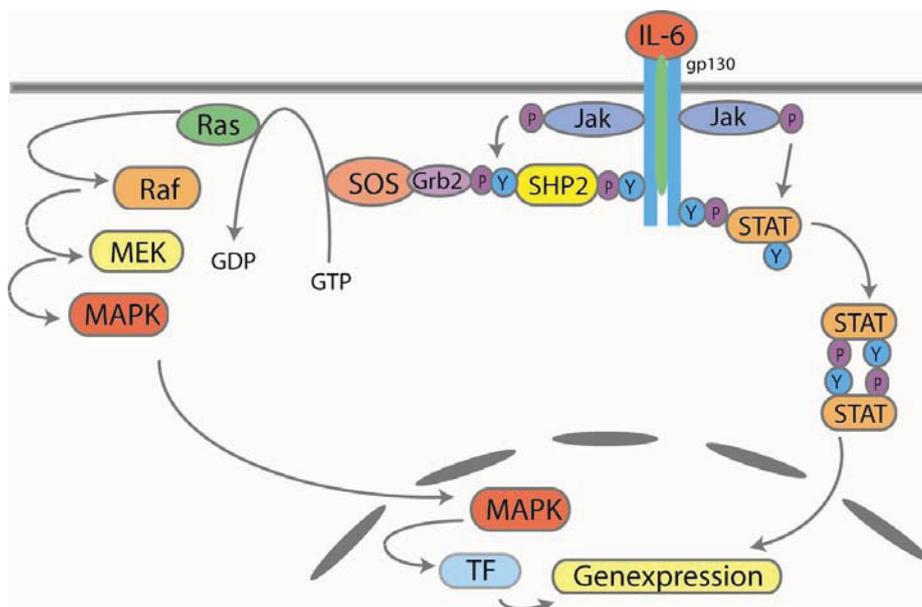
Der an der Signaltransduktion von IL-6 beteiligte Rezeptor wird unterteilt in den Ligandenspezifischen  $\alpha$ -Rezeptor IL-6R $\alpha$ , der auch als gp80 bezeichnet wird und keine intrazelluläre Signaltransduktion vermitteln kann, und die Signaltransduktion-vermittelnde Untereinheit gp130 (40;73).

IL-11, LIF (leukemia inhibiting factor), OSM (oncostatin M), CT-1 (cardiotrophin-1), CNTF (ciliary neurotrophic factor), CLC (cardiotrophin-like cytokine), NNT-1/BCF3 (novel neurotrophin-1/B cell stimulating factor-3) und IL-27 stellen andere IL-6-Typ-Zytokine dar. Jedes der IL-6-Typ-Zytokine vermittelt sein Signalling über verschiedene Rezeptoruntereinheiten, die als Hetero- oder Homodimere vorliegen. In allen Fällen ist mindestens ein gp130-Molekül beteiligt. IL-6, IL-11 und CNTF binden zuerst spezifisch an ihre entsprechenden  $\alpha$ -Rezeptor-Untereinheiten. Nur der Komplex des Zytokins und des  $\alpha$ -Rezeptors rekrutiert hier die Rezeptor-Untereinheiten effektiv. IL-6 und IL-11 sind die einzigen IL-6-Typ-Zytokine, die über gp130-Homodimere das Signal vermitteln; LIF, CNTF, CT-1 und CLC benötigen Heterodimere, bestehend aus gp130 und LIFR. OSM kann sowohl das Heterodimer gp130/LIFR als auch gp130/OSMR rekrutieren (7;40;74).

Da gp130 keine eigene enzymatische Aktivität besitzt, sind für die Signalübermittlung Rezeptor-assoziierte Moleküle wie zytosolische oder membranständige NRTKs (Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen) notwendig, die durch stimulierte Rezeptoren aktiviert werden und so die fehlende Kinaseaktivität ersetzen. Nach Anbindung von IL-6 an die  $\alpha$ -Untereinheit des Rezeptors erfolgt die Rekrutierung und Dimerisierung von gp130. Tyrosinkinasen der Janus-Familie (Jak 1/2) sind konstitutiv assoziiert zu der Rezeptoruntereinheit gp130 (40). Sie sind nun nach Zytokinbindung an den Rezeptor in der durch Autophosphorylierung aktivierten Form im Stande, bestimmte Tyrosinreste der intrazellulären gp130-Rezeptorkomponenten (Tyr<sup>759,767,814,905,915</sup>), sowie Tyrosinreste der STATs (signal transducers and activators of transcription) zu phosphorylieren (40). Voraussetzung für die Phosphorylierung/Aktivierung der STATs ist ihre transiente Assoziation mit den spezifischen phosphorylierten Tyrosinresten des gp130 über ihre SH2-Domäne. Nach der STAT-Phosphorylierung dissoziieren diese vom Rezeptor und es kommt konsekutiv zur Bindung der SH2-Domäne eines STAT-Moleküls an den Phosphotyrosinrest eines anderen STAT-Moleküls und so zur Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren. Es folgt die Translokation in den Zellkern, wo sie mit enhancer elements in Promotoren von Zielgenen interagieren und so zur Induktion derer Transkription führen,

möglicherweise in Einzelfällen auch zur Repression. Die STAT-Familie der Transkriptionsfaktoren umfasst sieben verschiedene Mitglieder (STAT1, -2, -3, -4, -5a, -5b und 6), welche mit Ausnahme von STAT4 ubiquitär exprimiert werden. IL-6-Stimulation führt über gp130/Jak1 zur Phosphorylierung von STAT3 am Tyrosin<sup>705</sup> und in einem geringeren Ausmaß zu einer Phosphorylierung von STAT1 am Tyrosin<sup>701</sup>. Neben der Tyrosinphosphorylierung von STATs können STAT1 und STAT3 ebenfalls im Bereich von Serin<sup>727</sup> phosphoryliert werden, was eine erhöhte transkriptionelle Aktivität zur Folge hat (40).

IL-6 stimuliert neben dem Jak/STAT-Signalweg den MAPK-Signalweg. Im Fall von gp130 erfolgt eine Rekrutierung der SHP2 (SH2-domain-containing tyrosine phosphatase) zur zytoplasmatischen Domäne des IL-6 Rezeptors (Tyr<sup>759</sup>). Anschließend wird SHP2 Jak1-abhängig phosphoryliert und interagiert dann mit Grb/SOS (growth factor receptor bound protein/Son of Sevenless). Die Rekrutierung von Grb2/SOS führt zur Ras-Aktivierung, welche konsekutiv zur Raf-Kinasen- und MAPK-Aktivierung führt (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3: IL-6-vermittelte Signaltransduktion**

IL-6 aktiviert den Jak/STAT-Signalweg und die MAPK-Kaskade (nähere Erläuterungen siehe Text).  
Modifiziert nach Heinrich (40).

Während gp130 auf allen Körperzellen zu finden ist, wird der membrangebundene gp80-Rezeptor nur von bestimmten Zellen expremiert, und so die Anzahl der Zellen, die auf IL-6-Typ-Zytokine reagieren können, limitiert.

Neben den beschriebenen klassischen Signalwegen, die den membrangebundenen gp80-Rezeptor beinhalten und hauptsächlich auf Hepatozyten, Neutrophilen, Monozyten/Makrophagen sowie anderen Leukozyten-Populationen zu finden sind, existiert jedoch ein alternativer Mechanismus, das sogenannte Trans-Signalling. Hierbei bindet IL-6 an einen löslichen IL-6- $\alpha$ -Rezeptor/gp80, der als Agonist an gp130 bindet und so die Signalkaskade aktivieren kann. Durch diesen Mechanismus ist IL-6 in der Lage, Zellen zu stimulieren, denen der membrangebundene IL-6- $\alpha$ -Rezeptor/gp80 fehlt; hohe Level von IL-6 und des löslichen Rezeptors konnten im Rahmen einer chronischen Inflammation, sowie bei Autoimmunerkrankungen und Tumorerkrankungen, beobachtet werden (82;83).

Für gp130 konnte gezeigt werden, dass die lösliche Form der gp130-Rezeptoruntereinheit als natürlicher Inhibitor des Trans-Signallings fungieren kann und so eine Krankheitsprogression unterbrochen wird. Da der lösliche IL-6- $\alpha$ -Rezeptor/gp80 die antagonistische Aktivität der löslichen gp130-Rezeptoruntereinheit zu potenzieren vermag und beide in menschlichem Serum vorhanden sind, könnte die Kombination löslicher gp80- und gp130-Rezeptoren als Puffer zur Modulation IL-6-induzierter systemischer Reaktionen angesehen werden (40;82).

Die Terminierung des Zytokinsignals mit dem Ziel der Prävention einer Überstimulation basiert auf verschiedenen Mechanismen (57;97). Auf den Jak/STAT-Pathway hemmend wirkende Zytokine vermitteln dies vor allem durch Expression von inhibitorischen Molekülen. Neben den PIAS (protein inhibitors of activated STATs) kommt der Familie der SOCS (suppressor of cytokine signalling) eine wesentliche Rolle zu. Weiterhin kann durch SHP2s eine Dephosphorylierung von Jaks oder STATs erfolgen (siehe Abbildung 4; zur strukturellen Organisation der Signalweg-Komponenten siehe Abbildung 5).

Zur Gruppe der PIAS zählen neben den für den STAT-Signalweg wichtigen PIAS1 und PIAS3 auch PIAS $\alpha$ , PIAS $\beta$  und PIAS $\gamma$ . Sie sind Hemmer des STAT-Signallings, indem sie als zytoplasmatische Faktoren die Bindung von aktivierten STAT-Komplexen an die DNA hemmen. PIAS3 ist spezifisch für die Inhibition der STAT3-vermittelten Geninduktion (20;97).

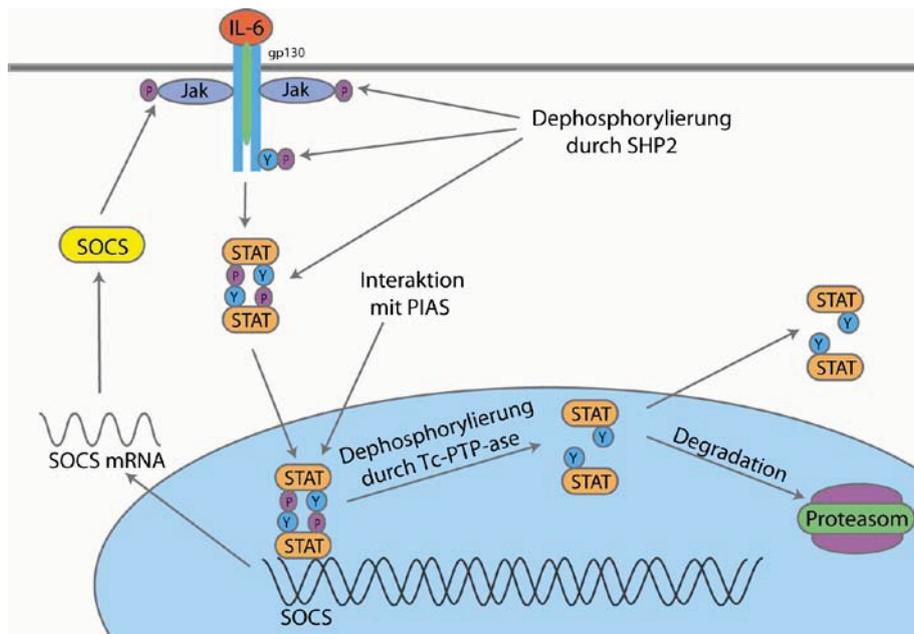
Die Gruppe der SOCS wird synonym JAB (Jak-binding protein), SSI (STAT-inducible STAT inhibitor) und CIS (cytokine inducible SH2 protein) genannt (4;5;24;57;97). Die SOCS-Familie umfasst acht Proteine, die als CIS sowie SOCS1 bis SOCS7 klassifiziert werden. SOCS3 und SOCS1 inhibieren hauptsächlich die Kinase-Aktivität von Jak2, indem sie mit

ihrer zentralen SH2-Domäne und ihrer KIR (kinase inhibitory region), die als nicht phosphoryliertes Pseudosubstrat wirkt, an die katalytische Region von Jak2 binden (70). SOCS1 bindet mit seiner SH2-Domäne an den phosphorylierten Tyrosinrest Tyr<sup>1007</sup> der JH1-Kinaseregion von Jak2; darüber hinaus ist auch eine Bindung von SOCS1 an Jak1, Jak3 und Tyk2 bekannt. SOCS3 besitzt weiterhin die Fähigkeit, an phosphorylierte Tyrosine der Zytokinrezeptoren wie gp130 (Tyr<sup>759</sup>) zu binden und so die Anbindung von STATs zu blockieren. Da die Genregulation von SOCS-Proteinen STAT-abhängig ist, üben SOCS1 und SOCS3 über die Inhibition der STAT3-Phosphorylierung einen negativen Effekt auf ihre eigene Expression aus, wodurch einer zellulären Akkumulation von SOCS-Proteinen entgegengesteuert wird (4;65).

Die Protein-Tyrosin Phosphatase SHP2 übt, neben positiver Wirkung auf die Aktivierung der MAPK, als Gegenspieler der phosphorylierenden Kinasen eine inhibierende (dephosphorylierende) Funktion auf den Jak/STAT-Signalweg aus (65). Die Bindung der SHP2 (über die SH2-Domäne) an den phosphorylierten zytoplasmatischen Tyrosinrest (Tyr<sup>759</sup>) der gp130-Rezeptoruntereinheit führt zu Aktivierung der SHP2 (45;65). Tyk2, Jak1 und Jak2 dienen als Substrate von SHP2, wodurch die IL-6-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung der Substrate vermindert wird (40).

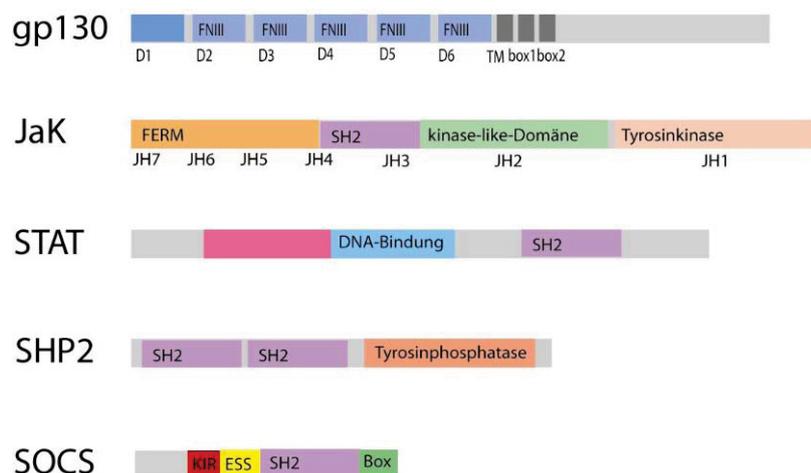
Auch die Degradation von STAT-Faktoren über das Proteasom (50) und die Dephosphorylierung der in den Zellkern translozierten STAT-Faktoren durch eine Tyrosin-Phosphatase (37) führen zur Inaktivierung des Jak/STAT-Pathways. Expressionsveränderungen von STATs können ebenfalls Einfluss auf das Signalling nehmen (53).

IL-6 besitzt eine wichtige Rolle für die Erhaltung der hepatischen Homöostase im Rahmen verschiedener pathologischer Ereignisse, und es aktiviert Zielgene, die beteiligt sind an der Differenzierung, Apoptose, Proliferation und der Akut-Phase-Antwort (40;73). Im Rahmen von Entzündungsreaktionen wird durch IL-6 die hepatische Produktion von Akut-Phase-Proteinen vom Typ 2, wie das C-reaktive Protein,  $\alpha_2$ -Makroglobulin, Fibrinogen, TIMP1 (tissue inhibitor of metalloproteinase) und  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin, induziert (73).



**Abbildung 4: Terminierung des IL-6-Signallings**

Darstellung der Interleukin-6-Signalterminierung durch SOCS, PIAS und SHP2 (nähere Erläuterungen siehe Text). Modifiziert nach Heinrich (40).



**Abbildung 5: Strukturelle Organisation verschiedener Komponenten der Signalübertragung von IL-6-Typ-Zytokinen**

Nähere Erklärungen zu den Interaktionen der einzelnen Komponenten siehe Text. Aus Heinrich (40).

Während cholestatischer Syndrome erfolgt eine verstärkte Expression von IL-6 und anderen Zytokinen (z.B. TNF- $\alpha$ ) mit erhöhten Serumspiegeln bei den jeweiligen Patienten, wodurch ein proliferationsfördernder und hepatoprotektiver Einfluss vermittelt wird (52;72). Hierbei wurde besonders die essentielle Rolle der IL-6-Rezeptoruntereinheit gp130 (Glykoprotein 130) mit Hilfe von gp130-Knockoutmäusen demonstriert: gp130 kontrolliert die Akut-Phase-Protein-Expression und schützt bei chronischer Cholestase vor bakterieller Überbesiedlung; nach partieller Hepatektomie werden über gp130 protektive Signalwege aktiviert, welche für die Leberregeneration von essentieller Bedeutung sind. Bei chronischen Leberkrankheiten schützt IL-6 gp130-abhängig vor Progression einer Leberfibrose und einer hepatozellulären Schädigung (92;93;98;99).

### 1.3.2 Crosstalk des IL-6-Signalweges

IL-6 steht in Wechselwirkung mit einer Vielzahl von Molekülen, die inhibitorisch bzw. aktivierend auf das Zytokin wirken, sowie Molekülen, die synergistisch mit IL-6 agieren oder ihrerseits durch das Interleukin aktiviert bzw. gehemmt werden (40).

Einen inhibierenden Einfluss auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion besitzen andere Zytokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) oder LPS (Lipopolysaccharid). IL-1, TNF- $\alpha$  und LPS inhibieren die IL-6-vermittelte STAT3-Aktivierung in Makrophagen durch Induktion der Neusynthese von SOCS3 bzw. Stabilisierung der mRNA, wodurch die Jak1 gehemmt wird (14;15;21). Weiterhin existieren von der de novo SOCS3-Synthese unabhängige Mechanismen der Hemmung der STAT3-Aktivierung durch IL-1, TNF $\alpha$  und LPS (1;21;71).

In Hepatozyten kann IL-1 $\beta$  die IL-6-induzierte  $\alpha_2$ M ( $\alpha_2$ -Makroglobulin)-Expression durch Beteiligung von NF- $\kappa$ B supprimieren (3;12). NF $\kappa$ B agiert hier als kompetitiver Inhibitor der STAT3-DNA-Bindung an die  $\alpha_2$ -Promoter-Region (102).

Auch Ethanol kann die IL-6-induzierte STAT3-Aktivierung und die IL-6 abhängige C/EBP (CCAAT enhancer binding protein)-Expression inhibieren, hierbei ist eine Beteiligung der PKC anzunehmen (19).

## **2. Fragestellung**

Ziel dieser Untersuchung war die Identifikation von Elementen des IL-6-Signalweges, die durch toxische und hepatoprotektive Gallensäuren in ihrer Aktivierung verändert werden, sowie die Analyse des zu Grunde liegenden molekularen Mechanismus.

## 3. Materialien und Methoden

### 3.1 Leberperfusion

Lebern von männlichen Wistar-Ratten (120-160 g Körpergewicht), ad libitum mit einer Standarddiät gefüttert, wurden nicht rezirkulierend über die Pfortader perfundiert (85;96). Der Perfusionspuffer bestand aus Krebs-Henseleit-Puffer (in mM/l: NaCl: 115, NaHCO<sub>3</sub>: 25, KCl: 5.9, MgCl<sub>2</sub>: 1.18, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:1.23, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 1.2 und CaCl<sub>2</sub>: 1.25), supplementiert mit 2.1 mM/l Lactat und 0.3 mM/l Pyruvat. Das Perfusat wurde mit O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5; v/v) bei 37°C äquilibriert und der Perfusionsfluss betrug 3.5-4 ml x g Leber<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>. Der Portaldruck wurde kontinuierlich mit einem Druckaufnehmer überwacht. Die Beurteilung der Viabilität des Lebergewebes erfolgte durch Messung der LDH-Freisetzung während der Perfusion. Die K<sup>+</sup>-Konzentration im Effluat wurde mit einer K<sup>+</sup>-sensitiven Elektrode gemessen.

Die Leberlappen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und bei 4°C in einem Lysispuffer mittels Ultra-Turax homogenisiert. Der Lysispuffer enthielt 20 mM/l Tris-HCl (pH 7.4), 140 mM/l NaCl, 10 mM/l NaF, 10 mM/l Natriumpyrophosphat, 1 % Triton X-100, 1 mM/l EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), 1 mM/l EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure), 1 mM/l Natriumvanadat, 20 mM/β<sup>-</sup>-Glycerophosphat und ein Protease-Inhibitor-Cocktail.

### 3.2 Isolation von primären Rattenhepatozyten und Zellkultur

Mittels Kollagenaseperfusion wurden isolierte Hepatozyten von männlichen Wistar-Ratten gewonnen (89;96); 1,5 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden auf mit Kollagen beschichteten Kulturschalen (36 mm Durchmesser) ausplattiert und zunächst für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Krebs-Henseleit-Puffer (in mM/l: NaCl: 115, NaHCO<sub>3</sub>: 25, KCl: 5.9, MgCl<sub>2</sub>: 1.18, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:1.23, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 1.2 und CaCl<sub>2</sub>: 1.25), supplementiert mit 6 mM/l Glucose, belassen. Im Anschluss daran wurden die Zellen zweimal gewaschen und für 24 Stunden in 1.5 ml Williams' E Medium kultiviert, supplementiert mit 2 mM/l Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 10<sup>-7</sup> M/l Insulin, 10<sup>-7</sup> M/l Dexamethason und 5 % FCS (Fötale Kälberserum). Zwei Stunden vor Experimentbeginn wurden die Zellen erneut gewaschen und

inkubiert mit 1.5 ml Williams' E Medium, supplementiert mit Glutamin (2 mM/l), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (0,1 mg/ml) und FCS (5 %). Die Viabilität der Hepatozyten wurde durch Trypanblau-Färbung bestimmt und betrug mehr als 95 %.

Weiterhin wurden HepG2-Zellen kultiviert, die mit dem NTCP (Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting protein)-Plasmid stabil transfeziert wurden (gekoppelt an EGFP [enhanced green fluorescent protein]) (58). Das HepG2-Medium bestand aus MEM (minimal essential medium), supplementiert mit 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren, 1 mM/l Natriumpyruvat, 2 mM/l Glutamin und 10 % FCS, nach Transfektion zusätzlich supplementiert mit 400 mg/l Geneticin.

Die Gallensäuren wurden bis auf TLCS in Medium gelöst, letzteres wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Inhibitoren wurden je nach Löslichkeit entweder in DMSO oder Medium aufgenommen. DMSO hatte in den eingesetzten Konzentrationen keinen Eigeneffekt auf die gemessenen Parameter.

Das Medium wurde nach Ablauf der Inkubationszeiten (Inhibitoren vor den Gallensäuren für 30 Minuten, Gallensäuren 1-6 Stunden, danach IL-6 für 20 Minuten) entfernt, und die Hepatozyten bzw. NTCP-HepG2-Zellen wurden unmittelbar bei 4°C mit einem Puffer (20 mM/l Tris-HCl (pH 7.4), 140 mM/l NaCl, 10 mM/l NaF, 10 mM/l Natriumpyrophosphat, 1 % Triton X-100, 1 mM/l EDTA, 1 mM/l EGTA, 1 mM/l Natriumvanadat, 20 mM/l  $\beta$ -Glycerophosphat und Protease-Inhibitor-Cocktail) lysiert. Die Homogenisate wurden bei 20000 g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert und die Überstände bei -20 °C gelagert.

### 3.3 Proteinbestimmung

Basierend auf der Methode nach Bradford (17) erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration. Basische Aminosäurereste von Proteinen bilden mit dem Farbstoff Comassie Brilliant Blue G-250 ionische Komplexe aus. Die Bindung dieses Farbstoffs an Proteine bewirkt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm (rot) auf 595 nm (blau), gleichzeitig steigt die Absorption bei 595 nm an; bei der Konzentrationsbestimmung der Proteine wird diese Änderung verfolgt.

Durchgeführt wurde die Proteinbestimmung in 1 ml Einwegküvetten,  $\mu$ 5 des Lysats der primären Hepatozyten/NTCP-HepG2-Zellen wurden mit 20  $\mu$ l Wasser verdünnt, zum Lysat der Hepatozyten aus der Leberperfusion wurden 40  $\mu$ l Wasser hinzugegeben. Ein Ansatz enthielt 5  $\mu$ l des jeweiligen verdünnten Puffers und 795  $\mu$ l Wasser. Durch Zugabe von 200  $\mu$ l

Bradfordreagenz und Mischen des Küvetteninhaltes wurde die Reaktion gestartet. Nach 20 Minuten konnte die Extinktion im Photometer bei 595 nm gemessen werden. In einer Eichgerade wurden die Extinktionen von BSA (Bovines Serumalbumin)-Lösungen gegen deren bekannte Konzentrationen dargestellt, und anhand der gemessenen Extinktion der Probe konnte die Proteinkonzentration in der Probe bestimmt werden.

### **3.4 Westernblot**

Gesamtproteinlysate wurde mit 1 Vol. Probenpuffer (0.1 M Tris (pH 6.8), 20 % Glycerin, 3.5 % SDS, 200 mM/l Dithiothreitol, 0.1 % Bromphenolblau) versetzt und nach fünfminütiger Inkubation bei 95 °C mittels SDS (Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (60 µg Protein, 10%-Gel). Die Gele wurden anschließend mit Transferpuffer (Glycin: 39 mM/l, Tris/HCl 48 mM/l, 0.03 % SDS, 20 % Methanol) equilibriert und die Proteine mittels eines „semi dry transfer“-Apparates auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Durch Behandlung mit 5 % BSA (in TBST [Tris-buffered saline tween]: 20 mM/l Tris/HCl (pH 7.5), 150 mM/l NaCl, 0.1 % Tween) bzw. 5 % Milchpulver (in TBST) wurden die Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert. Die Membranen wurden nach kurzem Waschen mit TBST bei 4°C drei bis vier Stunden mit dem ersten Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 inkubiert (Antikörper: gp80, gp130, STAT3, STAT1, phosphospezifisches STAT3 (Tyr<sup>705</sup>), phosphospezifisches STAT1 (Tyr<sup>701</sup>), Caspase 3, GAPDH [Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase]). Nach 30-minütigem Waschen der Membran erfolgte die Inkubation mit einem an Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper (Anti-Hase Immunglobulin G bzw. bei GAPDH Anti-Maus Immunglobulin G in der Verdünnung 1:10000) über zwei Stunden bei Raumtemperatur. Die Antikörperreaktion wurde nach erneutem Waschen mit dem ECL (enhanced chemiluminescence)-System detektiert.

### 3.5 Real Time PCR

Die Expression der gp130- und SOCS3-mRNA (messenger RNA) wurde mittels Real Time PCR analysiert. Primer für gp130, SOCS3 und HPRT1 (Referenzgen zur relativen Quantifizierung) waren wie folgt gestaltet:

Ratten-gp130-vorwärts: 5`CCGTCAGTGCAAGTGTTCTCA-3`,

Ratten-gp130-rückwärts: 5`CACTATCCACCAGCTGCAGGT-3`,

Ratten-SOCS3-vorwärts: 5`-CGAGAAGATCCCGCTGGTACT-3`,

Ratten-SOCS3-rückwärts: 5`-GTAGCCACGTTGGAGGAGAGA-3`,

Ratten-HPRT1-vorwärts: 5`-TGCTCGAGATGTCATGAAGGA-3`,

Ratten-HPRT1-rückwärts: 5`-CAGAGGGCCACAATGTGATG-3`.

Die Gesamt-RNA der Hepatozyten wurde mit dem Rneasy Mini Kit/QIA Shredder präpariert. Menge und Qualität der RNA wurden spektrometrisch (Absorption 280-320 nm) und mittels Kapillar-Elektrophorese erfasst.

Reverse Transkription und PCR wurden in zwei Schritten durchgeführt. Die Herstellung einer cDNA (complementary DNA) aus RNA mittels RT (Reverse Transkriptase) geschah mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit mit 1 µg g-RNA als Template. Dieser Schritt beinhaltete den Einsatz einer DNase I. Nach Anlagerung der strangspezifischen Primer (Primer-Annealing) wurde mittels einer Polymerase der Doppelstrang aufgefüllt und die Menge der Templates während der PCR mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR<sup>®</sup> Green Universal PCR MasterMix gemessen. Für die Reaktion wurde das 7500 Real-time PCR System verwendet, in 96-Well-Reaktionsplatten mit haftenden Abdeckungen.

Die Spezifität der RT-PCR wurde über Negativkontrollen in Form von Ansätzen ohne cDNA (NTC, non-template-control) bzw. ohne RT kontrolliert. Semiquantitative PCR-Ergebnisse wurden über die  $\Delta\Delta\text{CT}$  -Methode erworben (39;63;66). Schwellenwerte wurden zu HPRT1 normalisiert und in Referenz zu unstimulierten Kontrollzellen gesetzt.

### 3.6 Statistik

Die gezeigten Westernblots/PCRs sind repräsentativ für mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. Tabellarisch oder in Balkendiagramm dargestellte Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (Standardabweichung des Mittelwerts) ausgedrückt.

Die Untersuchung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels des Student-*t*-Test. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem Konfidenzintervall von 95% ( $p < 0.05$ ) als gegeben angesehen.

### 3.7 Materialien

<b>Geräte</b>	<b>Typenbezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Elektroblottingapparat	semi dry transfer Horizontal- apparat, Multiphor II	Pharmacia, Freiburg
Elektrophoresekammer	Z37, 507-1	Sigma-Aldrich, Steinheim
Entwicklermaschine	Agfa Curix 60	Agfa, München
K <sup>+</sup> -sensitive Elektrode		Radiometer, Willich
PCR System	7500 Real-time PCR	Applied Biosystems, Forster City, USA
RNA/DNA Kalkulator		GeneQuant II, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Spectrophotometer	4054 UV	LKB Biochrom, Cambridge, England
Thermoblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Mikro 24-48	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge	5415	Eppendorf, Hamburg
Waage	BP 1200	Sartorius, Göttingen
<b>(Verbrauchs-)Material</b>	<b>Typenbezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Einmal-Injektions-Kanüle	Ø 0,9 x 40 mm	Braun, Melsungen
Einmal-Spritze	20 ml	Braun, Melsungen
Einweg-Gewebekulturflasche	75 cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche	Greiner Bio-One, Solingen
Einweg-Gewebekulturschale	100 / Ø 20 mm	Greiner Bio-One, Solingen
Einweg-Pipette	Costar Stripette	Corning, München
Einweg-Sterilfilter	FP 30 / Ø 0,2 CA-S	Schleicher & Schüll, Dassel

Entwicklerflüssigkeit	enhanced chemiluminescent detection system; Supersignal West Pico	Pierce, Rockford, IL, USA
Filterpapier	Whatman Gelblottingpapier GB002	Schleicher & Schüll, Dassel
Fluoreszenzfarbstoff	SYBR <sup>®</sup> Green Universal PCR MasterMix	Qiagen, Hilden
Glasspritze	Hamilton Microliter	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Nitrozellulosemembran	Whatman Protran	Schleicher & Schüll, Dassel
Pipetten	Variable Mikroliter-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße		Eppendorf, Hamburg
Reverse Transkriptions-Set	QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNA-Isolierungs-Set	Rneasy Mini Kit /QIA Shredder	Qiagen, Hilden
Röntgenfilm	Hyperfilm-ECL	Amersham, Buckinghamshire, England
Sixwell-Gewebekulturplatte		Greiner Bio-One, Solingen
96-Well-Reaktionsplatten		Applied Biosystems, Forster City, USA

## Reagentien

## Firma

Bafilomycin A	Alexis Biochemicals, San Diego, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biochrom, Berlin
D-MEM/F12 (1:1) + Glutamax	Gibco, Paisley, Schottland
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Eggenstein
Geneticin	Gibco, Paisley, Schottland
Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glykochenodesoxycholol (GCDC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim

Interleukin-6	Biosource, Camarillo, USA
MG 132	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
Non-Fat Dry Milk	Bio-Rad, München
Oligonukleotide	MWG Biotech, Ebersberg
PD098059	Calbiochem, Bad Soden
Penicillin	Gibco, Paisley, Schottland
Ponceau S	Serva, Heidelberg
Protease-Inhibitor-Cocktail	Boehringer, Mannheim
Protein-Molekulargewichtsmarker Multimark	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
Protein-Molekulargewichtsmarker Rainbow	Amersham Pharmacia Biotech. Buckinghamshire, England
SB220025	Alexis Biochemicals, San Diego, USA
Streptomycin	Gibco, Paisley, Schottland
Taurochenodeoxycholsäure (TCDC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Taurolithocholat 3-Sulfat (TLCS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tauroursodesoxycholsäure (TUDC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Taurocholol (TC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin/EDTA Solution	Biochrom, Berlin
Williams' E Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Z-IETD-FMK (Caspase 8 Inhibitor)	R+D, Wiesbaden
Z-DEVD-FMK (Caspase 3 Inhibitor)	R+D, Wiesbaden
Z-VED-FMK (Pan-Caspase Inhibitor)	R+D, Wiesbaden

## **Antikörper**

Anti GAPDH  
 Anti gp130  
 Anti gp80  
 Anti Caspase 3  
 Anti Kaninchen IgG, Peroxidase gekoppelt

## **Firma**

Biodesign International, Saco, USA  
 Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA  
 Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA  
 Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA  
 Amersham Pharmacia Biotech.  
 Buckinghamshire, England

Anti Maus IgG, Peroxidase gekoppelt	Amersham Pharmacia Biotech. Buckinghamshire, England
Anti Phospho-STAT 1 (Tyr <sup>701</sup> )	New England Biolabs, Beverly, USA
Anti Phospho-STAT 3 (Tyr <sup>705</sup> )	New England Biolabs, Beverly, USA
Anti STAT 1	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA
Anti STAT 3	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA

Sämtlich hier nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) in der höchst verfügbaren Reinheit bezogen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Modulation der gp130-Proteinexpression durch Gallensäuren

#### 4.1.1 Effekte von Gallensäuren auf die gp130-Proteinexpression in primären Rattenhepatozyten und NTCP-transfzierten HepG2-Zellen

gp130 ist die signalvermittelnde Untereinheit des IL-6-Rezeptorkomplexes und ist an dem Signalling anderer IL-6-Typ-Zytokine (z.B. OSM, IL-11 oder LIF) beteiligt (40). Der Effekt der hydrophoben Gallensäure GCDC auf die gp130-Proteinexpression wurde in kultivierten primären Rattenhepatozyten und NTCP-transfzierten HepG2-Zellen untersucht.

Wie in Abbildung 6 A dargestellt, reguliert GCDC die gp130-Expression in Rattenhepatozyten herunter. Dieser Effekt beginnt nach einstündiger Inkubation mit GCDC (in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M/l}$ ) und führt binnen drei Stunden zu einem signifikanten Abfall der gp130-Expression, während die GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)-Expression unbeeinflusst bleibt.

Auch in HepG2-Zellen, die mit dem NTCP-Plasmid transfiziert wurden, induziert GCDC (in einer Konzentration von 200  $\mu\text{M/l}$ ) innerhalb von sechs Stunden eine Downregulation des gp130 (Abbildung 6 B).

Neben GCDC wurde der Einfluss weiterer Gallensäuren auf das IL-6-Signalling untersucht (Abbildung 6 C). Die Gallensäuren TLCS (Taurolithocholsäure-3-sulfat) und TCDC (Taurochenodeoxycholsäure) (jeweils in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M/l}$ ), die zwei weitere Apoptose auslösende Gallensäuren repräsentieren (33;76;80;91;101), führen ebenfalls zu einer Downregulation des gp130 in Rattenhepatozyten; dahingegen können die zwei hydrophilen Gallensäuren TUDC (Tauroursodeoxycholsäure) und TC (Taurocholsäure) (jeweils 100  $\mu\text{M/l}$ ) keine Expressionsabnahme des gp130 bewirken (Abbildung 6 C).

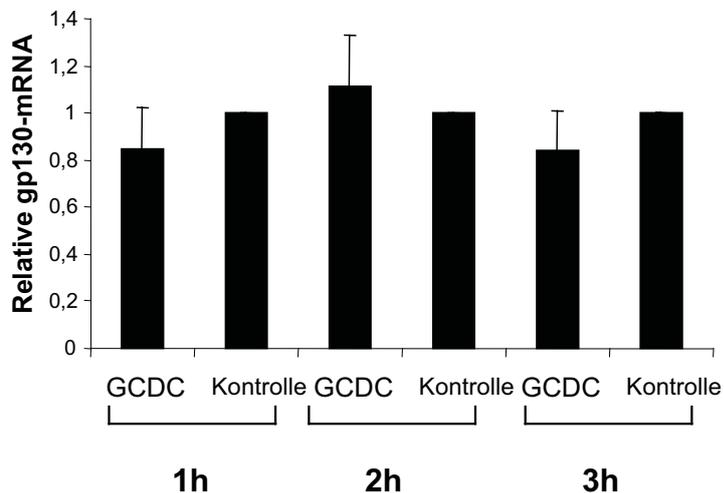
Der IL6-Rezeptorkomplex besteht zusätzlich zu der gp130-Einheit noch aus der Ligandenbindenden Einheit gp80. Wie in Abbildung 6 D gezeigt, hat GCDC keinen Einfluss auf die Expression des gp80 in Rattenhepatozyten. Dies zeigt sich analog in NTCP-transfzierten HepG2-Zellen (Daten nicht gezeigt).



(C) Rattenhepatozyten wurden mit TCDC, TUDC, TC, TLCS und GCDC (jeweils 100  $\mu$ M/l) für drei Stunden inkubiert oder unbehandelt belassen.

(D) Primäre Rattenhepatozyten wurden mit bzw. ohne GCDC (100  $\mu$ M/l) für drei Stunden inkubiert.

In Anbetracht der stark erniedrigten gp130-Proteinexpression in Gegenwart von GCDC wurde weiterhin die GCDC-Wirkung auf Transkriptionsebene untersucht. GCDC hat keinen Einfluss auf die mRNA von gp130 (Abbildung 7), so dass ein posttranskriptioneller Mechanismus für die gp130-Herunterregulation ursächlich zu sein scheint.

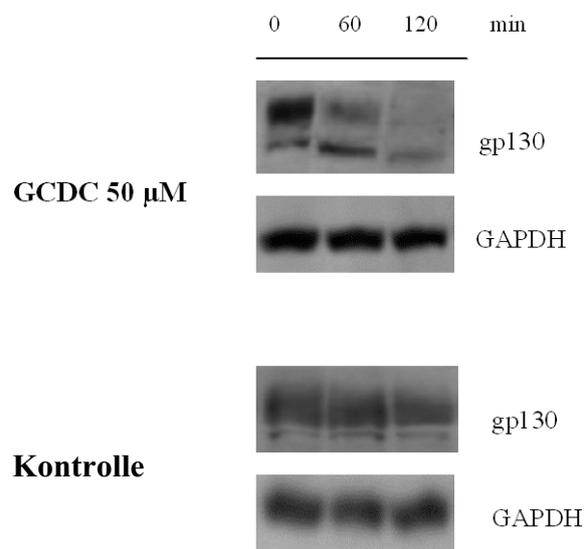


#### Abbildung 7: Einfluss von GCDC auf die mRNA von gp130

Primäre Rattenhepatozyten wurden mit oder ohne GCDC (100 $\mu$ M/l) für die angegebenen Zeitintervalle inkubiert und die mRNA präpariert. gp130-mRNA-Level wurden mit Hilfe der real time PCR analysiert. Hierzu wurden Primer benutzt, die Spezifität für Ratten-gp130 mRNA besitzen (siehe Methodenteil PCR). Als Housekeeping-Gen wurde Ratten-HPRT1 benutzt; semi-quantitative mRNA-Level wurden mit Hilfe der  $\Delta\Delta$ CT-Methode berechnet (39;66). Die Daten wurden in Relation zu den jeweiligen Spiegeln der unstimulierten Kontrollen ausgedrückt, welche als 1 gesetzt wurden.

#### 4.1.2 Effekte von GCDC auf die gp130-Proteinexpression in der perfundierten Rattenleber

Zur Bestätigung der Daten, die in den Zellkulturexperimenten gewonnen wurden, wurde der Einfluss von GCDC in dem Modell der Leberperfusion untersucht. Zugabe von GCDC zum Perfusionsmedium (in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M/l}$ ) führt zu einem fast vollständigen Verschwinden des gp130-Proteins innerhalb von zwei Stunden. Bei Anwendung des GCDC-freien Perfusionsmediums konnte keine Veränderung der gp130-Expression beobachtet werden (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Effekte von GCDC auf die gp130-Proteinexpression in der Leberperfusion**

Isolierte Rattenlebern wurden mit GCDC (50  $\mu\text{M/l}$ ) perfundiert und die Leberlappen zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen ( $t = 0$  Minuten unmittelbar vor der Hinzugabe von GCDC zum Perfusat). 60  $\mu\text{g}$  des Proteins wurden zur Bestimmung des gesamten gp130 und der GAPDH mittels Immunoblot verwendet.

### **4.1.3 Rolle des Proteasoms bzw. Lysosoms für die GCDC-induzierte gp130-Degradation**

Die gp130-Rezeptoruntereinheit hat eine Halbwertszeit von 2,5 Stunden und wird normalerweise lysosomal degradiert (31;90). Unter bestimmten experimentellen Bedingungen wurde jedoch auch ein proteasomaler Abbauweg beschrieben (9).

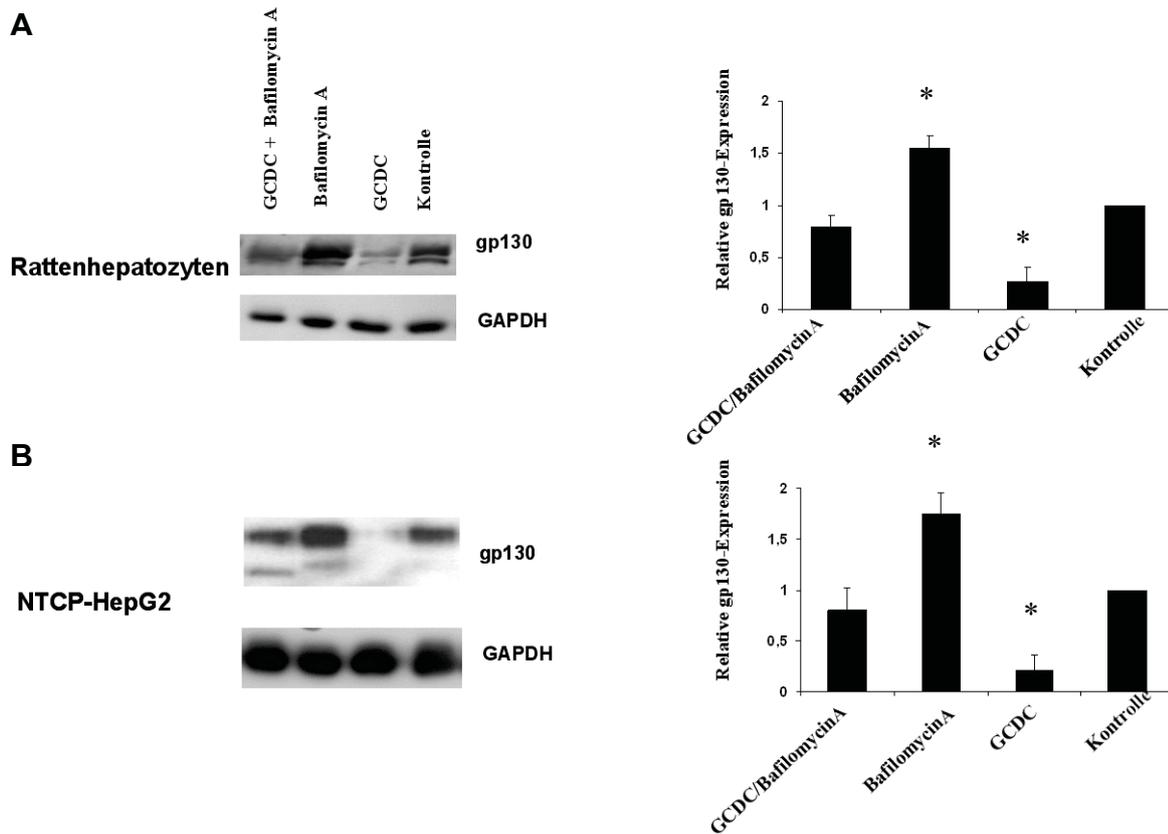
Um die Rolle der lysosomalen Proteolyse für die GCDC-induzierte Downregulation des gp130 zu untersuchen, wurde Bafilomycin A (250 nM/l) eingesetzt. Bafilomycin A ist ein Inhibitor der lysosomalen Ansäuerung und blockiert somit die lysosomale Degradation.

Abbildung 9 zeigt die ansteigende Expression des gp130 in primären Rattenhepatozyten nach Behandlung mit Bafilomycin A, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle; dies spiegelt wahrscheinlich die Inhibition des basalen gp130-Umsatzes wieder, der normalerweise durch eine lysosomale Degradierung hervorgerufen wird. Die GCDC-induzierte Downregulation von gp130 in Rattenhepatozyten und NTCP-HepG2-Zellen hingegen bleibt, verglichen mit den jeweiligen Kontrollen, in Gegenwart von Bafilomycin größtenteils erhalten (Abbildung 9). Das bedeutet, dass das Lysosom eher keine Rolle bei der gp130-Degradation durch GCDC spielt.

Die Bedeutung des Proteasoms für die gp130-Degradierung durch GCDC wurde mittels des spezifischen Inhibitors MG132 untersucht.

Entsprechend Bafilomycin A zeigt MG132 in Hepatozyten keine Wirkung auf die GCDC-induzierte gp130-Downregulation (Abbildung 10). Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass der Effekt von GCDC auf die gp130-Proteinspiegel nicht durch eine erhöhte lysosomale oder proteasomale Degradierung von gp130 erklärt werden kann.

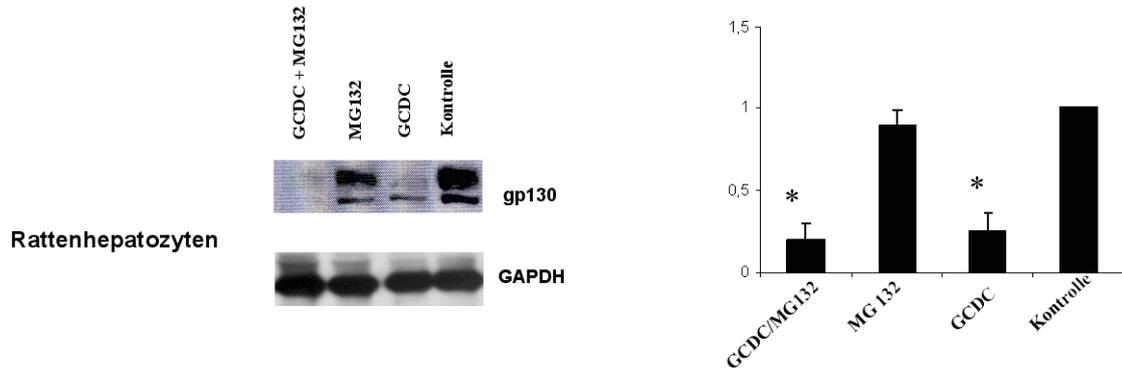
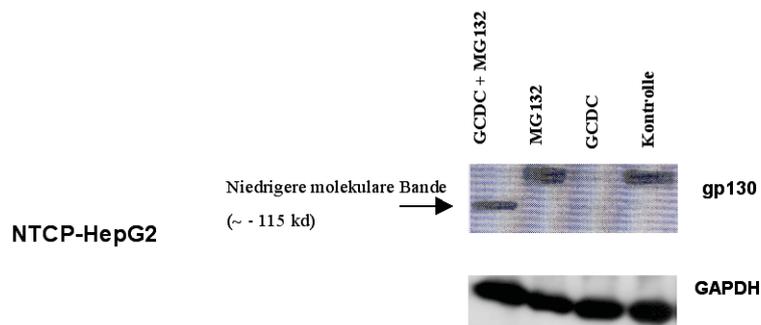
In NTCP-HepG2-Zellen wurden vergleichbare Ergebnisse erworben, jedoch induziert GCDC hier in Anwesenheit von MG132 das Erscheinen einer Bande mit niedrigerem molekularem Gewicht (um die 115 kD), welche immunoreaktiv für den gp130-Antikörper ist, der für die gp130-Detektion benutzt wird (Abbildung 10). Das lässt die Entstehung eines immunoreaktiven gp130-Spaltproduktes in Gegenwart von GCDC vermuten, welches nach Inhibition des Proteasoms akkumuliert.



### Abbildung 9: Rolle des Lysosoms für die Herunterregulation von gp130

24 Stunden kultivierte primäre Rattenhepatozyten (A) wurden für drei Stunden mit GCDC (100  $\mu\text{M/l}$ ) inkubiert oder unbehandelt belassen. Bafilomycin A (250 nM/l) wurde 30 Minuten vor Gallensäureninkubation hinzugegeben. Weiterhin wurden NTCP-transfezierte HepG2-Zellen (B) für sechs Stunden mit GCDC (200  $\mu\text{M/l}$ ) stimuliert, Bafilomycin A (250 nM/l) wurde, wenn indiziert, 30 Minuten zuvor hinzugefügt.

Anschließend wurden Extrakte des Gesamtproteins verarbeitet; 60  $\mu\text{g}$  des Proteins wurden mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper auf ihre gp130- sowie GAPDH-Expression untersucht. Die relative gp130-Expression wurde mittels Densitometrie gemessen und auf unstimulierte Kontrollzellen bezogen, welche als 1 festgesetzt wurden. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (Standardabweichung des Mittelwerts) ausgedrückt (n=4). \*  $p < 0.05$ .

**A****B**

### Abbildung 10: Rolle des Proteasoms für die Herunterregulation von gp130

Hepatozyten (A) und NTCP-transfezierte HepG2-Zellen (B) wurden mit GCDC (100  $\mu\text{M/l}$ , 200  $\mu\text{M/l}$ ) für drei bzw. sechs Stunden inkubiert oder unbehandelt belassen. MG132 (25  $\mu\text{M/l}$ ) wurde, wenn eingesetzt, 30 Minuten vor Gallensäureninkubation zum Kulturmedium hinzugegeben.

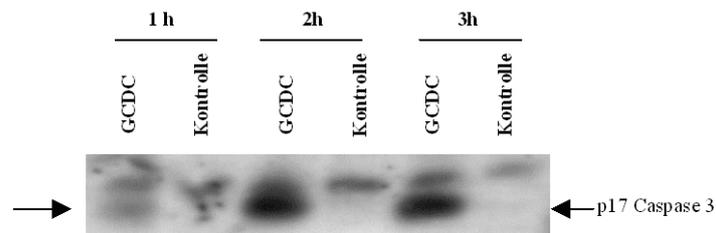
Das Gesamtprotein wurde mit Hilfe des Immunoblots auf die Expression von gp130 und GAPDH analysiert. Die relative gp130-Expression wurde in den Hepatozyten mittels Densitometrie gemessen und zu unstimulierten Kontrollzellen in Relation gesetzt, welche als 1 festgesetzt wurden. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (Standardabweichung des Mittelwerts) ausgedrückt (n=4). \*  $p < 0.05$ .

In NTCP-transfezierten HepG2-Zellen (B) induzierte GCDC in Anwesenheit von MG132 das Erscheinen einer Bande mit einem niedrigeren Molekulargewicht (markiert mit  $\rightarrow$ ). Diese Bande ist immunoreaktiv für den gp130-spezifischen Antikörper und könnte eine truncierte Form der gp130-Untereinheit darstellen. Auf Grund dieser Bande, die nicht näher identifiziert werden konnte, wurde für gp130 in Anwesenheit von MG132 in NTCP-transfezierten HepG2-Zellen keine Densitometrie angefertigt.

#### 4.1.4 Rolle der Caspasen für die GCDC-induzierte gp130-Downregulation

Hydrophobe, proapoptotische Gallensäuren wie GCDC, TLCS und TCDC sind bekannte Aktivatoren von Caspasen in Hepatozyten (33;49;76;80;91;101).

In Abbildung 11 ist dargestellt, dass GCDC zu einer Aktivierung der Caspase 3 in Rattenhepatozyten führt, welche bereits nach einer Stunde auftritt und nach zwei Stunden signifikant wird. Diese Zeitspanne der Caspase-Aktivierung korreliert mit dem Beginn der GCDC-induzierten Herunterregulation von gp130. Auf Grund dessen wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die gp130-Downregulation über einen Caspase-abhängigen Weg vermittelt wird; zu diesem Zweck wurden Studien mit Caspaseninhibitoren durchgeführt.



**Abbildung 11: Aktivierung der Caspase 3 durch GCDC**

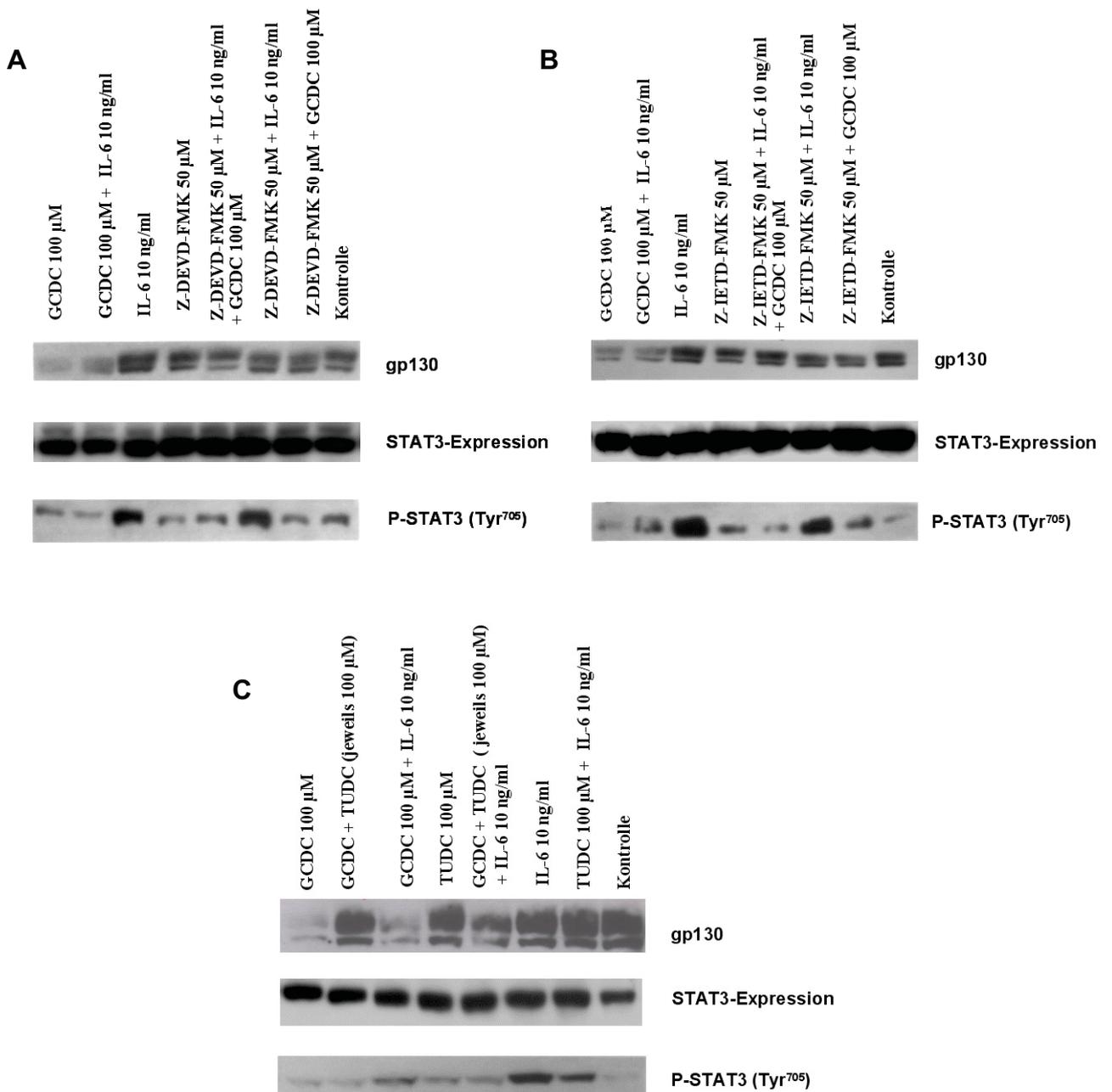
Primäre Ratten-Hepatozyten wurden für 24 Stunden kultiviert, wie im Methodenteil beschrieben. Die Zellen wurden mit oder ohne GCDC (100  $\mu\text{M/l}$ ) für die angegebenen Zeitperioden (eine bis drei Stunden) stimuliert. 60  $\mu\text{g}$  des gesamten Proteins wurden im Immunoblot aufgetragen und mittels des spezifischen Antikörpers für die p17 Caspase 3 analysiert.

In Abbildung 12 A ist dargestellt, dass nach Anwendung von Z-DEVD-FMK (50  $\mu\text{M/l}$ ), einem Caspase 3-Inhibitor, die Herunterregulation des gp130 in Anwesenheit von GCDC in primären Rattenhepatozyten annähernd vollständig blockiert ist.

Ähnliches kann für die gp130-Downregulation nach Inkubation mit Z-IETD-FMK (50  $\mu\text{M/l}$ ), einem Caspase 8-Inhibitor, beobachtet werden (Abbildung 12 B).

Weiterhin verhindert der Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK (50  $\mu\text{M/l}$ ) die GCDC-induzierte Downregulation von gp130 in NTCP-transfezierten HepG2-Zellen (Daten nicht gezeigt).

TUDC, eine anti-apoptotische Gallensäure, kann die Caspasenaktivierung durch hydrophobe Gallensäuren blockieren (33). Eine gleichzeitige Inkubation von TUDC (100  $\mu$ M/l) mit GCDC verhindert in Hepatozyten auch die gp130-Herunterregulation (Abbildung 12 C). Dies ist als weiterer Hinweis zu werten, dass die Caspase 3 an der gp130-Herunterregulation durch GCDC beteiligt ist.



**Abbildung 12: Wirkung von Caspase-Inhibitoren und TUDC auf die gp130-Herunterregulation**

60  $\mu$ g des Proteins wurden mittels Immunoblot auf die gp130-Proteinexpression untersucht, weiterhin wurden die STAT3-Tyr<sup>705</sup>-Phosphorylierung sowie die STAT3-Protein-Level bestimmt.

(A) Primäre Rattenhepatozyten wurden mit GCDC (100  $\mu\text{M/l}$ ) für drei Stunden inkubiert oder unbehandelt belassen, anschließend wurde die Inkubation fortgeführt, in An- bzw. Abwesenheit von IL-6 (10 ng/ml für 20 Minuten). Wenn eingesetzt, wurden die Zellen für 30 Minuten vor Gallensäurenstimulation mit dem Caspase 3-Inhibitor Z-DEVD-FMK (50  $\mu\text{mol/l}$ ) vorbehandelt.

(B) Analog zu den Inkubationszeiten in A wurden die primären Rattenhepatozyten mit dem Caspase 8-Inhibitor Z-IETD-FMK (50  $\mu\text{M/l}$ ) vorinkubiert.

(C) Rattenhepatozyten wurden mit GCDC, TUDC oder der Kombination beider Gallensäuren (jeweils 100  $\mu\text{M/l}$ ) für drei Stunden inkubiert bzw. unbehandelt belassen. IL-6 (10 ng/ml) wurde, wenn indiziert, nach drei Stunden hinzugegeben und die Inkubation für weitere 20 Minuten fortgeführt. Das Gesamt-Protein wurde, wie beschrieben, mittels Immunoblot analysiert.

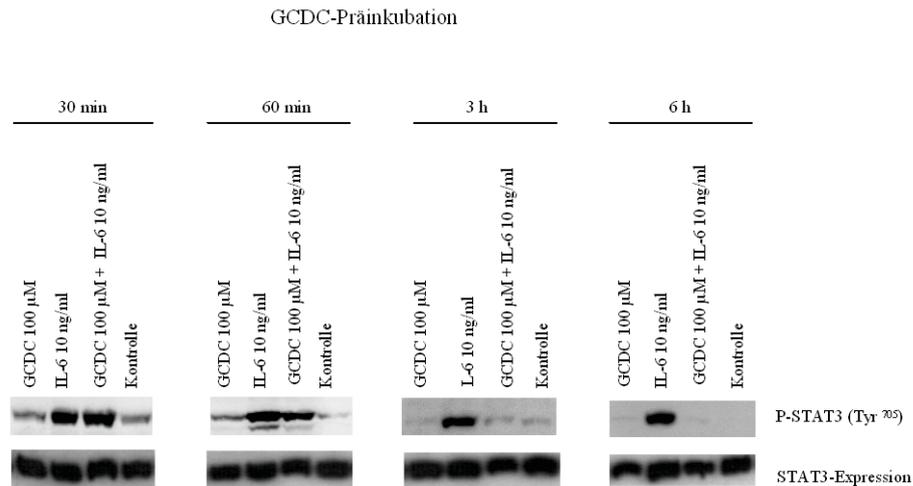
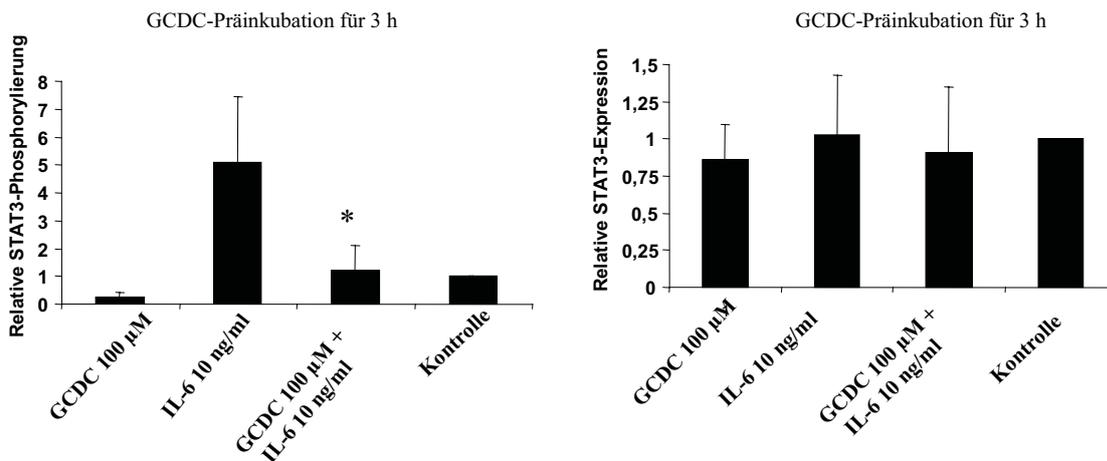
## **4.2 Modulation der IL-6-induzierten STAT-Phosphorylierung durch Gallensäuren**

### **4.2.1 Effekte von GCDC auf die Phosphorylierung der STAT-Proteine in primären Rattenhepatozyten und NTCP-transfizierten HepG2-Zellen**

Voraussetzung für die Phosphorylierung/Aktivierung der STATs nach IL-6-Stimulation ist ihre transiente Assoziation mit den spezifischen phosphorylierten Tyrosinresten des gp130. Nach STAT-Phosphorylierung (durch Jaks) kommt es konsekutiv zu Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren. Es folgt die Translokation in den Zellkern, hier interagieren die STATs mit enhancer elements in Promotoren von Zielgenen und führen so zur Induktion derer Transkription (40).

Abbildung 13 A zeigt die Tyrosinphosphorylierung (Tyr<sup>705</sup>) von STAT3 nach Stimulation mit Interleukin-6 (10 ng/ml) für 20 Minuten und deren Modulation durch GCDC (100  $\mu\text{M/l}$ ) in 24 Stunden kultivierten Rattenhepatozyten. Vorinkubation mit GCDC hemmt die STAT3-Tyr<sup>705</sup>-Phosphorylierung Zeit- und Konzentrationsabhängig. Eine signifikante Inhibition der IL-6-induzierten STAT3-Phosphorylierung ist nach einer Präinkubationsperiode von mindestens einer Stunde festzustellen (Abbildung 13 A, B).

GCDC-Konzentrationen von 25  $\mu\text{M/l}$  sind bereits ausreichend, die STAT3-Aktivierung partiell zu hemmen (Abbildung 14).

**A****B**

### Abbildung 13: Modulation der IL-6-vermittelten Phosphorylierung von STAT3 durch GCDC

(A) 24 Stunden kultivierte Rattenhepatozyten wurden mit GCDC (100  $\mu$ M/l) für die angegebenen Zeit-Perioden (30 Minuten bis sechs Stunden) präinkubiert oder uninkubiert (Kontrolle) belassen. Zum indizierten Zeitpunkt wurde IL-6 (10 ng/ml) für weitere 20 Minuten nach der GCDC-Präinkubations-Zeit hinzugegeben. Anschließend wurden Extrakte des Gesamtproteins verarbeitet. 60  $\mu$ g des Proteins wurden mittels Immunoblot-Analyse untersucht auf ihre STAT3-Tyr<sup>705</sup>-Phosphorylierung und es wurde das Gesamt-STAT3-Protein bestimmt. Hierfür wurden Antikörper mit Spezifität für STAT3 oder phosphoryliertes STAT3 (Tyr<sup>705</sup>) benutzt.

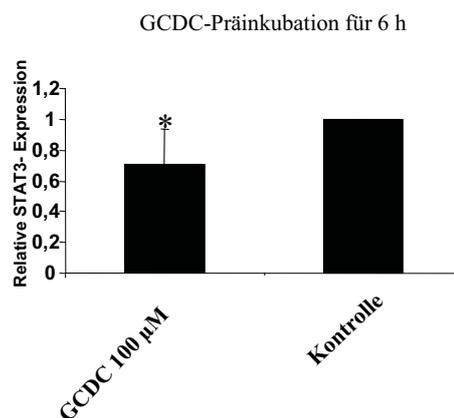
(B) Mit Hilfe der Densitometrie wurde die relative STAT3-Phosphorylierung nach drei Stunden Vorinkubation mit GCDC (100  $\mu$ M/l) erfasst und auf die jeweiligen Level in unstimulierten Zellen bezogen, welche als 1 festgesetzt wurden. Zudem wurde die relative STAT3-Expression nach dreistündiger GCDC-Inkubation densitometrisch bestimmt und auf unstimulierte Zellen bezogen, welche als 1 festgesetzt wurden. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (Standardabweichung des Mittelwerts) ausgedrückt (n=4). \*  $p < 0.05$ .



**Abbildung 14: Konzentrationsabhängige Inhibition der STAT3-Phosphorylierung durch GCDC**

Ratten-Hepatozyten wurden für drei Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von GCDC inkubiert oder unbehandelt belassen (Kontrolle). Daraufhin wurden die Hepatozyten für 20 Minuten mit IL-6 (10 ng/ml) stimuliert und das Gesamtprotein auf die STAT3-Tyr<sup>705</sup>-Phosphorylierung und STAT3-Expression untersucht.

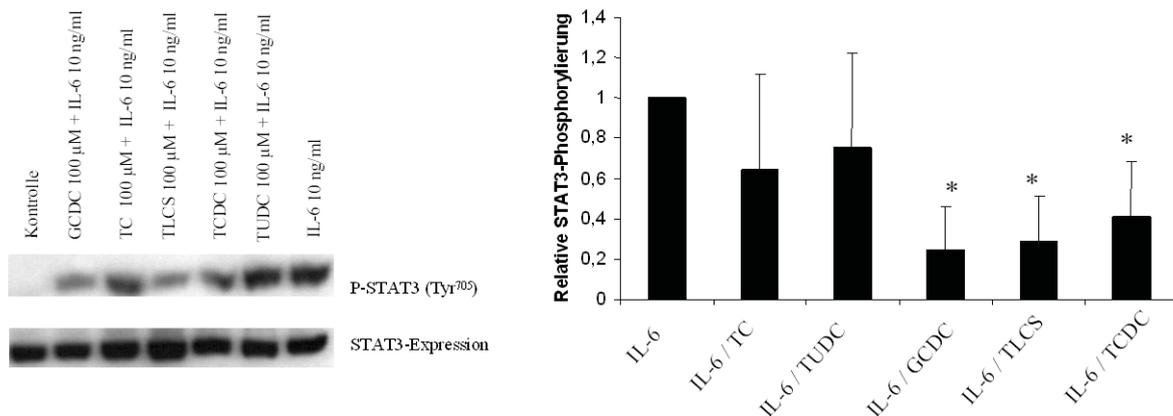
Die Proteinexpression von STAT3 ist innerhalb der ersten drei Stunden nicht signifikant verändert (Abbildung 13 A, 13 B, 14). Die Ausdehnung der Präinkubationszeit von GCDC bis zu sechs Stunden führt zu einer signifikanten Minderung der STAT3-Proteinexpression (Abbildung 15). Aus diesem Grunde wurden alle weiteren Experimente mit einer Präinkubationszeit der Gallensäuren von drei Stunden ausgeführt.



**Abbildung 15: Effekt von GCDC auf die STAT3-Proteinexpression**

Die Gesamt-STAT3-Proteinexpression wurde nach sechs Stunden GCDC-Präinkubation (100 μM/l) untersucht; mittels Densitometrie wurde die relative STAT3-Expression gemessen und auf unstimulierte Kontrollzellen bezogen, welche als 1 festgesetzt wurden. Die Daten werden als Mittelwerte ± S.E.M. (Standardabweichung des Mittelwerts) ausgedrückt (n=4). \* p < 0.05.

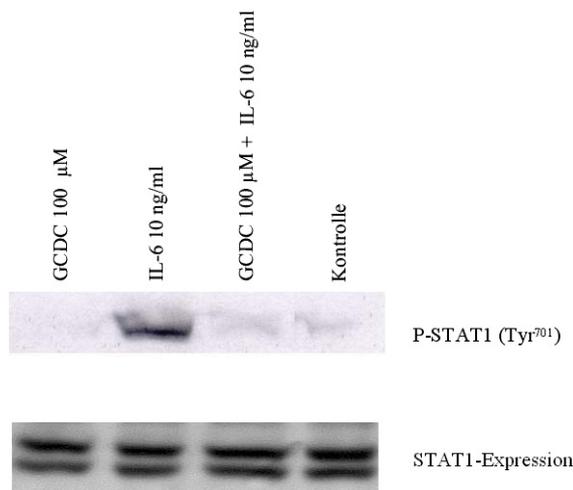
Abgesehen von GCDC wurden auch andere pro- und anti-apoptotische Gallensäuren (jeweils 100  $\mu\text{M/l}$ ) bezüglich ihrer Wirkung auf die STAT-Phosphorylierung untersucht. Wie die Abbildung 16 zeigt, inhibieren die proapoptotischen Gallensäuren GCDC, TLCS und TCDC die IL-6-induzierte STAT3-Tyr<sup>705</sup>-Phosphorylierung, wohingegen die anti-apoptotischen Gallensäuren TC und TUDC keinen Einfluss auf die STAT3-Tyr<sup>705</sup>-Phosphorylierung haben.



#### Abbildung 16: Wirkung verschiedener Gallensäuren auf die STAT3-Phosphorylierung

Primäre Ratten-Hepatozyten wurden, wie im Methodenteil beschrieben, präpariert. 24 Stunden nach Präparation wurden die Zellen mit TC, TUDC, GCDC, TLCS und TUDC (jeweils 100  $\mu\text{M/l}$ ) für drei Stunden inkubiert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen mit IL-6 (10 ng/ml) für 20 Minuten stimuliert. Die Gesamt-Zell-Lysate wurden in Hinblick auf die STAT3-Tyr<sup>705</sup>-Phosphorylierung und die Gesamt-STAT3-Expression analysiert, indem 60  $\mu\text{g}$  des Proteins im Immunoblot analysiert wurden; es wurden Antikörper mit einer Spezifität für STAT3 oder phosphoryliertes STAT3 (Tyr<sup>705</sup>) benutzt. Die relative STAT3-Phosphorylierung wurde mittels Densitometrie gemessen und zu IL-6-stimulierten Kontrollzellen in Relation gesetzt, welche als 1 festgesetzt wurden. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (Standardabweichung des Mittelwerts) ausgedrückt (n=4). \* p < 0.05

Neben STAT3 ist auch STAT1 von der GCDC-Wirkung in Hepatozyten betroffen, da auch die IL-6-induzierte STAT1-Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung in Anwesenheit von GCDC vermindert ist (Abbildung 17).

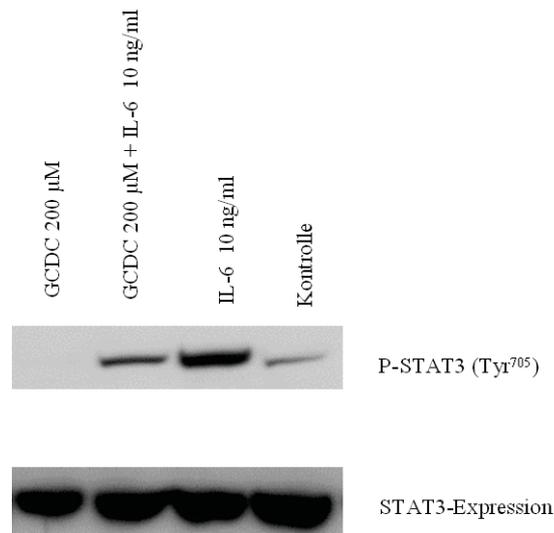


**Abbildung 17: Einfluss von GCDC auf die Phosphorylierung von STAT1**

Rattenhepatozyten wurden mit 100 µM/GCDC für drei Stunden vorbehandelt und nachfolgend für 20 Minuten mit IL-6 inkubiert. Darauf folgend wurde die STAT1-Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung und Gesamt-STAT1-Proteinexpression mittels Immunoblot untersucht. Es wurden spezifische Antikörper gegen P-STAT1 (Tyr<sup>701</sup>) und STAT1, wie im Methodenteil beschrieben, benutzt.

Native HepG2-Zellen waren insensitiv hinsichtlich des inhibitorischen Effektes von GCDC auf die IL-6-induzierte STAT3-Tyr<sup>705</sup>-Phosphorylierung (Daten nicht gezeigt). Nachdem die HepG2-Zellen mit dem NTCP-Plasmid stabil transfeziert wurden, zeigten sie den Hepatozyten vergleichbare Ergebnisse.

Abbildung 18 illustriert die Hemmung der STAT3-Tyr<sup>705</sup>-Phosphorylierung nach Präinkubation mit GCDC in NTCP-transfezierten HepG2-Zellen. Jedoch waren, verglichen mit den Rattenhepatozyten, längere GCDC-Präinkubations-Perioden (sechs Stunden) und höhere Konzentrationen von GCDC (200 µM/l) erforderlich, um diesen Effekt in NTCP-HepG2-Zellen zu erzielen. Höchstwahrscheinlich ist dies durch die Differenzen in der Gallensäuren-Aufnahme der Zellen verursacht.

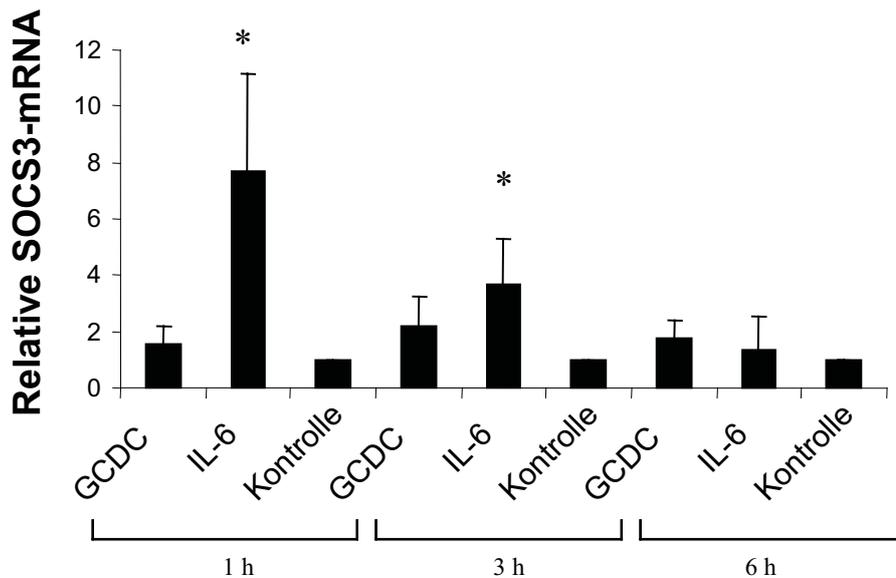


**Abbildung 18: Effekt von GCDC auf die STAT3-Phosphorylierung in NTCP-HepG2-Zellen**

HepG2-Zellen, die stabil mit dem NTCP-Plasmid transfeziert wurden, wurden mit GCDC (200 µM/l) für sechs Stunden vorbehandelt und für weitere 20 Minuten mit IL-6 stimuliert. Die Phosphorylierung des STAT3-Tyr<sup>705</sup> und die Gesamt-STAT3-Expression wurden analysiert, indem 60 µg des Proteins im Immunoblot analysiert wurden; es wurden Antikörper mit einer Spezifität für STAT3 oder phosphoryliertes STAT3 (Tyr<sup>705</sup>) benutzt.

#### 4.2.2 Molekulare Mechanismen der GCDC-induzierten Hemmung der STAT3-Phosphorylierung

SOCS-Proteine sind bekannte Inhibitoren der Jak/STAT-Signalkaskade und ihre Expression wird überwiegend auf dem Level der Transkription reguliert (56;97). IL-6 induziert bekanntermaßen die SOCS3-mRNA nach ca. einer Stunde Inkubationszeit, wie mittels real time PCR in Abbildung 19 gezeigt. GCDC zeigt hingegen keinen signifikanten Effekt auf die SOCS-mRNA-Spiegel in Rattenhepatozyten (Abbildung 19). Daraus lässt sich folgern, dass SOCS3 nicht ursächlich für den inhibitorischen Effekt von GCDC auf die IL-6-induzierte STAT-Phosphorylierung zu sein scheint.

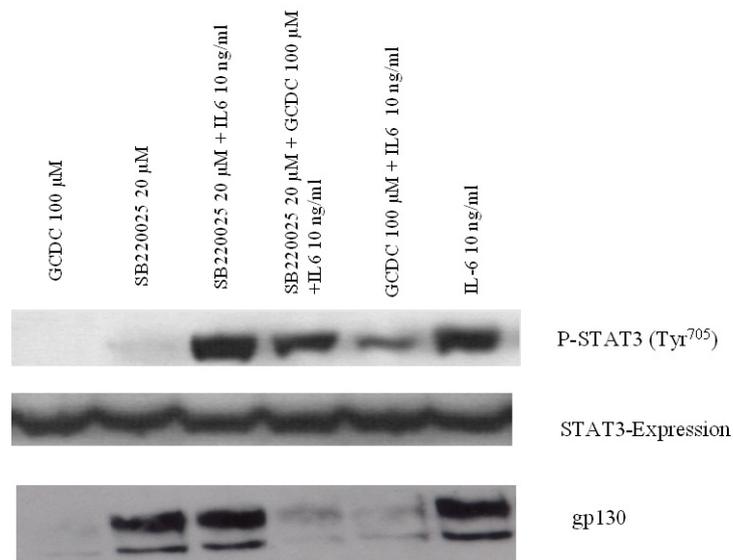


**Abbildung 19: Einfluss von IL-6 und GCDC auf die SOCS3-mRNA**

Primäre Rattenhepatozyten wurden mit IL-6 (10 ng/ml) oder GCDC (100  $\mu$ M/l) für die angegebenen Zeitperioden behandelt und die Gesamt-mRNA präpariert. SOCS3-mRNA-Level wurden mittels der real time PCR analysiert, hierzu wurden für Ratten-SOCS3-mRNA spezifische Primer verwandt (siehe auch Methodenteil PCR); als Housekeeping-Gen wurde Ratten-HPRT1 benutzt. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mit Hilfe der  $\Delta\Delta$ CT-Methode berechnet (39;66). Die Daten werden in Relation zu den jeweiligen Spiegeln der unstimulierten Kontrollen gesetzt, welche als 1 festgelegt wurden (ausgedrückt als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (Standardabweichung des Mittelwerts) (n=4) \* p < 0.05).

Gallensäuren aktivieren MAP-Kinasen wie die Erks und die  $p38^{MAPK}$  (33;61;85). MAP-Kinasen sind weiterhin bekannte Regulatoren des IL-6-Signalweges (13;14;40). Folglich wurde die Beteiligung von MAP-Kinasen an der GCDC-induzierten Hemmung der STAT3-Phosphorylierung in Rattenhepatozyten vermutet und untersucht. Es wurden zwei Inhibitoren verwendet, SB220025, der die  $p38^{MAPK}$  hemmt, und PD089059, der die MEK1 (mitogen-activated protein kinase/Erk-Kinase) hemmt. Präinkubation der Hepatozyten mit SB220025 (20  $\mu$ M/l) verhindert die Inhibition der IL-6-induzierten STAT3-Phosphorylierung durch GCDC in Hepatozyten zumindest teilweise (Abbildung 20). PD098059 (10  $\mu$ M/l) blieb diesbezüglich ineffektiv (Daten nicht gezeigt).

Diese Erkenntnisse deuten auf die Mitwirkung der  $p38^{MAPK}$ , nicht jedoch der MAPK vom Erk-Typ (33;60;61;85) an der Inhibition der IL-6-induzierten STAT3-Phosphorylierung hin.



**Abbildung 20: Effekt der Inhibition der p38<sup>MAPK</sup> auf die Hemmung der STAT3-Phosphorylierung durch GCDC**

Primäre Rattenhepatozyten wurden mit GCDC (100 μM/l) für drei Stunden inkubiert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen mit IL-6 (10 ng/ml) für 20 Minuten stimuliert. Wie angegeben wurden die Zellen mit SB220025 (20 μM/l) 30 Minuten vor Gallensäuren-Stimulation vorinkubiert. Das gesamte Proteinlysate wurde auf die STAT3-<sup>705</sup>Y-Phosphorylierung, die Gesamt-STAT3- oder die gp130-Proteinexpression analysiert; dies geschah durch eine Immunoblot-Analyse mit Hilfe spezifischer Antikörper. SB220025 stellte die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung (Tyr<sup>705</sup>) in Gegenwart von GCDC partiell wieder her, ohne jedoch die GCDC-induzierte Down-Regulation der gp130-Rezeptoruntereinheit wiederherstellen zu können.

Interessanterweise hatte SB220025 keinen Effekt auf die GCDC-induzierte gp130-Downregulation (Abbildung 20). Andererseits waren die Caspase-Inhibitoren der Caspasen 3 und 8 und TUDC, die die GCDC-induzierte gp130-Downregulation größtenteils verhindern konnten, nicht in der Lage, die GCDC-induzierte Hemmung der STAT3-Phosphorylierung in Hepatozyten aufzuheben (Abbildungen 12 A, B, C). Dies zeigt, dass Gallensäuren die STAT3-Phosphorylierung via eines gp130-unabhängigen und über einen noch nicht geklärten p38<sup>MAPK</sup>-abhängigen Signalweg hemmen.

## 5. Diskussion

### 5.1 Modulation des IL-6-Signalweges durch Gallensäuren

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass hydrophobe Gallensäuren die IL-6-induzierte STAT3-Tyrosin<sup>705</sup>-Phosphorylierung in primären Ratten-Hepatozyten und NTCP-transfuzierten HepG2-Zellen inhibieren. Dieser Effekt ist Zeit-, Konzentrations-, und Gallensäure-abhängig. Toxische und proapoptotische Gallensäuren wie GCDC, TUDC oder TLCS, nicht aber die protektiv wirkenden Gallensäuren TC und TUDC, sind in der Lage, die IL-6-vermittelte STAT3-Aktivierung in Hepatozyten zu hemmen.

Weiterhin konnte in drei Versuchsmodellen gezeigt werden, dass hydrophobe Gallensäuren die gp130-Proteinexpression herunterregulieren, nämlich in primären Rattenhepatozyten, NTCP-transfuzierten HepG2-Zellen und der perfundierten Rattenleber. Da die gp130-mRNA-Spiegel in Hepatozyten durch Gallensäuren unbeeinflusst blieben, kann ein vermehrter Abbau des gp130-Protein vermutet werden.

Normalerweise wird gp130 lysosomal degradiert, aber unter bestimmten experimentellen Bedingungen wurde auch ein proteasomaler Abbau beschrieben (9;31). Die Rolle dieser physiologischen Abbauewege für den Gallensäuren-induzierten Abbau von gp130 wurde mittels spezifischer Inhibitoren untersucht. Pharmakologische Inhibition der lysosomalen Degradierung durch Bafilomycin A einerseits oder der proteasomalen Degradierung durch MG132 andererseits verhinderte nicht die GCDC-induzierte Abnahme der gp130-Proteinexpression in Hepatozyten sowie NTCP-transfuzierten HepG2-Zellen. So scheinen diese beiden Abbaumechanismen nicht ursächlich für die Gallensäuren-induzierte gp130-Downregulation zu sein.

Hingegen konnte der Nachweis erbracht werden, dass die gp130-Protein-Downregulation durch Gallensäuren Caspase-abhängig ist. Unsere Hypothese, dass die gp130-Protein-Downregulation in Gegenwart von toxischen Gallensäuren durch Caspase-Aktivierung verursacht wird, wird durch drei Beobachtungen gestützt:

(a) GCDC induziert in Rattenhepatozyten die Aktivierung der Caspase 3 innerhalb einer Stunde. Diese Kinetik zeigt eine zeitliche Parallelität zur GCDC-induzierten Herunterregulation von gp130.

(b) Die GCDC-induzierte gp130-Downregulation konnte in Hepatozyten als sensitiv gegenüber Caspase-Inhibitoren identifiziert werden. Z-DEVD-FMK, als Inhibitor der Caspase 3, und Z-IETD-FMK, als Inhibitor der Caspase 8, können die Degradation von gp130 in Anwesenheit von GCDC fast komplett blockieren.

(c) Die anti-apoptotische Gallensäure TUDC, die die Caspase-Aktivierung durch hydrophobe Gallensäuren verhindern kann (33), blockiert ebenfalls die GCDC-induzierte Abnahme der gp130-Expression in Hepatozyten.

Caspasen repräsentieren eine Familie von Cystein-Proteasen, die ein vier Aminosäuren beinhaltendes Motiv ihres entsprechenden Liganden erkennen, nämlich P4-P3-P2-P1. In der Regel finden sich die Caspase-Schnittstellen nach dem C-terminalen Rest (P1), der für gewöhnlich ein Aspartat ist.

Caspase-abhängiges Cleavage konnte für verschiedene Gruppen von Molekülen gezeigt werden, z.B. für Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B, STAT1, CREB [CRE-bindendes Protein]), Zellzyklus-regulatorische Proteine (Cykline, Retinoblastom-Protein), in die Signaltransduktion involvierte Kinasen (PKB, PKC, MEK) oder Proteine, die am Aufbau von zytoplasmatischen (Aktin, Vimentin) oder nukleären Proteinen (Nukleoporine) sowie DNA-Reparatur, -synthese und -cleavage (PARP [Poly(ADP-Ribose)-Polymerase], Topoisomerasen) beteiligt sind (28). In letzter Zeit wurden zunehmend auch verschiedene Plasmamembranrezeptoren als Substrate von Caspasen identifiziert (6;28;32;38;100). Caspasen nehmen insofern Einfluss auf die Signaltransduktion der Zelle, als dass das Cleavage der Rezeptoren die Aktivierung ihres Liganden-induzierten intrazellulären Signallings blockiert. So wurde z.B. für den EGF-Rezeptor oder den HGF- (MET-)Rezeptor ein Caspase-abhängiges Cleavage mit Inhibition des spezifischen Signalweges beschrieben (32;38).

Auch die Mitglieder der sogenannten „dependence receptor“-Gruppe (z.B. DCC [deleted in colorectal cancer], RET [rearranged during transfection], MET, p75<sup>NTR</sup>) zeigen eine Spaltung durch Caspasen (18;32;68). Sie stellen eine funktionell zusammengehörige Gruppe von Rezeptoren dar, die in Anwesenheit ihrer Liganden mitogene, proliferative und anti-apoptotische Signale vermitteln, um das Überleben der Zelle sicherzustellen. Hingegen werden sie in Abwesenheit der Liganden zu pro-apoptotischen Faktoren, da dann über Caspasen-vermittelte Spaltung der Rezeptoren an bestimmten Schnittstellen (sog. Cleavage-Motive) pro-apoptotische Rezeptorfragmente oder bisher maskierte Todes-Domänen entstehen, die zum Zelltod führen.

Die nun an der GCDC-induzierten gp130-Degradation als beteiligt vermutete Caspase 3 spaltet ihr Substrat an einem Aspartat-Rest in Position 1 des Substrates und ihr präferiertes Schnittmotiv stellt die Aminosäuresequenz DXXD (D-Aspartat, X-variabel) dar. Im zytoplasmatischen Anteil des humanen, murinen und Ratten-gp130 finden sich zwei überlappende DXXD-Motive (Position 800-806, human). Folglich ist es gut vorstellbar, dass via Caspase 3 ein Cleavage im Bereich dieses Schnittmotivs resultieren kann. Spaltung des Rezeptors an dieser Stelle würde zu Entstehung eines aus 125 Aminosäuren bestehenden Fragmentes am C-terminalen Ende des gp130 führen. Interessanterweise würde das Cleavage des gp130 an diesen Motiven in einem Rezeptor resultieren, dem die drei distalen Tyrosin-Motive (Tyr<sup>814</sup>, Tyr<sup>905</sup>, Tyr<sup>915</sup>) fehlen. Diese Motive sind relevant für die Rekrutierung und die darauffolgende Aktivierung der STATs (40), währenddessen die übrigen weiter proximal gelegenen Tyrosin-Motive essentiell für die Rekrutierung der Tyrosinphosphatase SHP2 und von SOCS3 zum gp130 sind. Dies würde in einem trunkierten Rezeptor resultieren, der eine Aktivierung der MAP-Kinasen-Kaskade via SHP2 vermitteln kann, jedoch keine IL6-induzierte STAT-Aktivierung (40;65).

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Caspasen, neben ihrer Rolle in der Apoptose, auch zur Induktion der zellulären Resistenz gegenüber multiplen Zytokinen führen können. An der Stelle soll bedacht werden, dass sich eine Caspase-Aktivierung auch ohne die Auslösung einer Apoptose z.B. als Reaktion auf milden hyperosmotischen Stress ereignet, was eine Caspasenbeteiligung in nicht-apoptotischen Zellfunktionen durch die Modulation des IL-6-Signalweges unterstützen würde (78). Die Aktivierung von Caspasen spielt, neben der Ausführung ihrer klassischen Funktion als Induktoren des apoptotischen Zelltodes, eine wichtige Rolle bei anderen zellulären, nicht-apoptotischen, Prozessen wie Inflammation, T-Zell-Proliferation, Regulation des Zellzyklus, Zell-Differenzierung sowie der Aktivierung von NF-κB (2;62;78;86).

In Einklang mit der Rolle der Caspasen bei der Induktion der gp130-Degradierung stehen die Erkenntnisse, dass in Multiplen Myelom-Zelllinien die Inhibition des Proteasoms in einem Pan-Caspase-Inhibitor-sensitiven Abfall des gp130 und der Inhibition der STAT3-Aktivierung resultiert (42).

Da die Inhibition der STAT3-Phosphorylierung im Zeitverlauf annähernd parallel mit der Verminderung des gp130-Proteinspiegels verlief, wurde die Rolle von Caspasen für die Wirkung der Gallensäuren auf STAT-Ebene mittels Inhibitoren untersucht. Die Hemmung der gp130-Downregulation in Hepatozyten durch Caspase-Inhibitoren stellte die IL-6-vermittelte STAT3-Aktivierung in Gegenwart hydrophober Gallensäuren nicht wieder her. Dies zeigt,

dass neben der Caspase-abhängigen Herunterregulation des gp130 noch andere Mechanismen existieren müssen, die Einfluss auf die Gallensäuren-vermittelte Inhibition der STAT-Phosphorylierung haben. So wurde die Inhibition der IL-6-induzierten STAT3-Aktivierung in Hepatozyten zumindest teilweise durch die Blockade der p38<sup>MAPK</sup> wiederhergestellt; die gp130-Protein-Spiegel blieben hierbei unverändert. Folglich konnte ein p38<sup>MAPK</sup>-abhängiger Mechanismus als mitwirkend an der Gallensäuren-induzierten Inhibition der STAT3-Aktivierung identifiziert werden, unabhängig von der Abnahme der gp130-Expression.

Die Elemente des Signalweges, die für die p38<sup>MAPK</sup>-sensitive Inhibition der STAT3-Aktivierung in Gegenwart proapoptotischer Gallensäuren verantwortlich sind, sind unklar. Wie in der vorliegenden Arbeit für Gallensäuren demonstriert, supprimieren auch Moleküle wie TNF- $\alpha$ , LPS und IL-1 $\beta$  die IL-6-vermittelte Aktivierung von STAT3 auf einem Weg, der p38<sup>MAPK</sup>-abhängig ist (12-15). Es wurde gezeigt, dass die Inhibition der IL-6-induzierten STAT3-Aktivierung durch TNF $\alpha$  durch eine p38<sup>MAPK</sup>-abhängige Induktion von SOCS3 bedingt ist, der einen potenten Inhibitor der IL-6-vermittelten STAT3-Aktivierung darstellt. Dies lässt vermuten, dass TNF- $\alpha$  die STAT3-Aktivierung zumindest in gewissem Grade durch eine Induktion von SOCS3 inhibiert (13;15). Naheliegender erscheint, dass SOCS3 ebenso an der Gallensäuren-induzierten STAT3-Aktivierungs-Inhibition beteiligt sein könnte. Jedoch induzieren hydrophobe Gallensäuren keine signifikante SOCS3-mRNA in Hepatozyten, was eine Erklärung der Inhibitionsvorgänge über eine SOCS-Induktion ausschließt. Es bleibt unklar, ob andere kürzlich publizierte molekulare Mechanismen der Inhibition der STAT3-Phosphorylierung, wie z.B. die Rekrutierung von SHP2 oder ein p38<sup>MAPK</sup>-vermittelter posttranslatonaler Effekt auf gp130, involviert sind (1). Man muss bedenken, dass die p38<sup>MAPK</sup> als Serin/Threonin-Kinase in der Lage ist, Serin-Reste von Proteinen zu phosphorylieren; Phosphorylierung von Serin- oder Threoninresten von Rezeptorproteinen ist häufig mit negativer Rezeptor-Modulation assoziiert (48;88). Phosphorylierung am Internalisierungsmotiv Serin-782 (Ser<sup>782</sup>) des gp130 führt zur Modulation der Rezeptoraktivität, Endozytose des Rezeptors und damit zur Downstream-Inhibition der Signalkaskade, die auch den Schritt der STAT-Aktivierung beinhaltet (30). Möglicherweise kann via der p38<sup>MAPK</sup> eine Phosphorylierung des Ser<sup>782</sup> am gp130 durch Gallensäuren induziert werden, welche zur Inhibition des gp130-abhängigen Signallings führt.

Es ist gut dokumentiert, dass die STAT3-Aktivierung einen Mediator für Signale darstellt, die essentiell sind für die zelluläre Proliferation und das zelluläre Überleben. STAT3 aktiviert verschiedene Gene, die in der Kontrolle des Zellzyklus involviert sind, wie z.B. die Cycline D1, D2 und D3; weiterhin werden durch STAT3 Gene aktiviert, die antiapoptotisch wirken,

wie c-myc, bcl-xl oder bcl (44;75). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Induktion der Apoptose in Anwesenheit hydrophober Gallensäuren nicht nur die Signalkaskaden-Aktivierung mit der Endstrecke der CD95- bzw. Caspasen-Aktivierung beinhaltet (33;76;91), sondern auch die Downregulation antiapoptotischer Signale umfasst.

Interleukin-6 ist ein pleiotropes Zytokin mit einer Vielfalt von biologischen Aktivitäten bei Entzündung, der Immunregulation, der Hämatopoese und der Onkogenese; es wird bei Infektionen und Verletzungen sezerniert. Eine der biologischen Funktionen von IL-6 betrifft seine Wirkung auf Hepatozyten; IL-6 induziert die Synthese und Sekretion von Akut-Phase-Proteinen (APP) vom Typ2 und wirkt synergistisch mit IL-1 bei der Synthese und Sekretion von Akut-Phase-Proteinen Typ1 (z.B. C-reaktives Protein, Serum Amyloid A, Serum Amyloid P, Komplementfaktoren, Koagulationsfaktoren, Proteaseinhibitoren, metallbindende Proteine u.a.) (7;40).

Die essentielle Rolle von IL-6 für die hepatische Homöostase im Rahmen von Leberschädigungen verdeutlichen Studien mit IL-6-Knockout-Mäusen, da diese eine stark erhöhte Sensitivität für hepatotoxische Substanzen wie z.B. Endotoxin zeigen (25;54;87). Weiterhin wurde beschrieben, dass sich IL-6-Knockout-Tiere, im Vergleich zu Wild-Typ-Mäusen, 12 Wochen nach Gallengangsligation in einem fortgeschritteneren Stadium der biliären Fibrose befinden, welches mit höheren Serum-Bilirubin-Spiegeln sowie erhöhter Mortalität assoziiert ist (25). Die Rolle von IL-6 für die Leber-Regeneration hingegen wird kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite ist IL-6 an der Induktion der Hepatozyten-Proliferation beteiligt. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass nach partieller Hepatektomie die Leberregeneration in IL-6-defizienten Tieren stark vermindert ist (22). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass IL-6 nach partieller Hepatektomie protektive Signalwege induziert, ohne einen signifikanten Einfluss auf die Hepatozyten-Proliferation zu nehmen. Überstimulation mit IL-6 führte sogar zu Inhibition der Hepatozyten-Proliferation (10).

Auch gp130-Knockout-Mäuse zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber toxischen Einflüssen und eine erhöhte Mortalität während cholestatischer Syndrome. Dies betont die tragende Rolle der gp130/Jak/STAT-Signalkaskade für die protektive Wirkung von IL-6 während diverser Lebererkrankungen (92;93;98).

Im Rahmen cholestatischer Lebererkrankungen akkumulieren Gallensäuren, die aufgrund ihres pro-apoptischen Charakters und ihrer oxidativen Stress induzierenden, Mitochondrien-schädigenden und cholestatichen Wirkung, die Hepatotoxizität triggern (27;76;77;94;101).

Nun sind auch bei cholestatischen Lebererkrankungen die IL-6-Spiegel im Serum erhöht und es wird ein hepatoprotektiver Effekt hierdurch vermutet (51;52;87;98). Auf der anderen Seite zeigen z.B. cholestatische Patienten mit Leberzirrhose eine herabgesetzte Kapazität der Leberregeneration und ein obstruktiver Ikterus ist mit erhöhter Anfälligkeit für Toxine in Mensch- und Tiermodellen assoziiert (51;67;69).

Diese Aspekte lassen vermuten, dass Gallensäuren im Rahmen cholestatischer Syndrome eine IL-6-antagonistische Wirkung besitzen.

Die Fähigkeit, neben der Zerstörung der Zelle durch Apoptose weiterhin Zytokin-Signalwege zu modifizieren, stellt demnach möglicherweise einen weiteren Aspekt der Hepatotoxizität von Gallensäuren dar.

Wir zeigen in dieser Arbeit, dass hydrophobe Gallensäuren via eines Caspase-abhängigen und eines p38<sup>MAPK</sup>-abhängigen Signalweges die IL-6-vermittelte Signaltransduktion hemmen und dadurch möglicherweise die protektive Wirkung dieses Zytokins blockieren.

## 6. Zusammenfassung

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin mit pro- sowie anti-inflammatorischen Eigenschaften (7). Es besitzt eine wichtige Rolle für die Erhaltung der hepatischen Homöostase im Rahmen verschiedener pathologischer Ereignisse und aktiviert Zielgene, die beteiligt sind an der Kontrolle des Zellzyklus, Differenzierung, Apoptose, Regeneration, Proliferation und der Akut-Phase-Antwort (40). Es wurde gezeigt, dass IL-6 vor Leberschäden durch Ethanol oder CCL<sub>4</sub> schützt, auch vermittelt es günstige Effekte in Ischämie/Reperfusion-Modellen sowie bei anderen chronischen Leberkrankheiten wie einer obstruktiven Cholestase (22;25;46;54;92;93). Im Rahmen cholestatischer Syndrome finden sich erhöhte IL-6-Serumspiegel bei den Patienten und man postuliert einen hepatoprotektiven Effekt durch dieses Zytokin (52;72;87;98).

Während cholestatischer Syndrome akkumulieren Gallensäuren und triggern die Hepatotoxizität z.B. durch Induktion der Apoptose von Hepatozyten. Die Apoptose infolge Einwirkung hydrophober Gallensäuren ereignet sich *in vivo* und *in vitro* und involviert eine Liganden-unabhängige CD95-Aktivierung mit darauffolgender Caspase 8- und Caspase 3-Aktivierung (33;49;76;80;91;101).

In dieser Arbeit dienen primäre Rattenhepatozyten sowie NTCP-transfezierte HepG2-Zellen und die perfundierte Rattenleber als Modelle, eine IL-6-antagonistische Wirkung von Gallensäuren zu zeigen. Der Einfluss verschiedener Gallensäuren auf die IL-6-vermittelte Signaltransduktion wird auf zwei Ebenen der Signalkette analysiert, der Rezeptorebene und der Ebene der Aktivierung von STAT3.

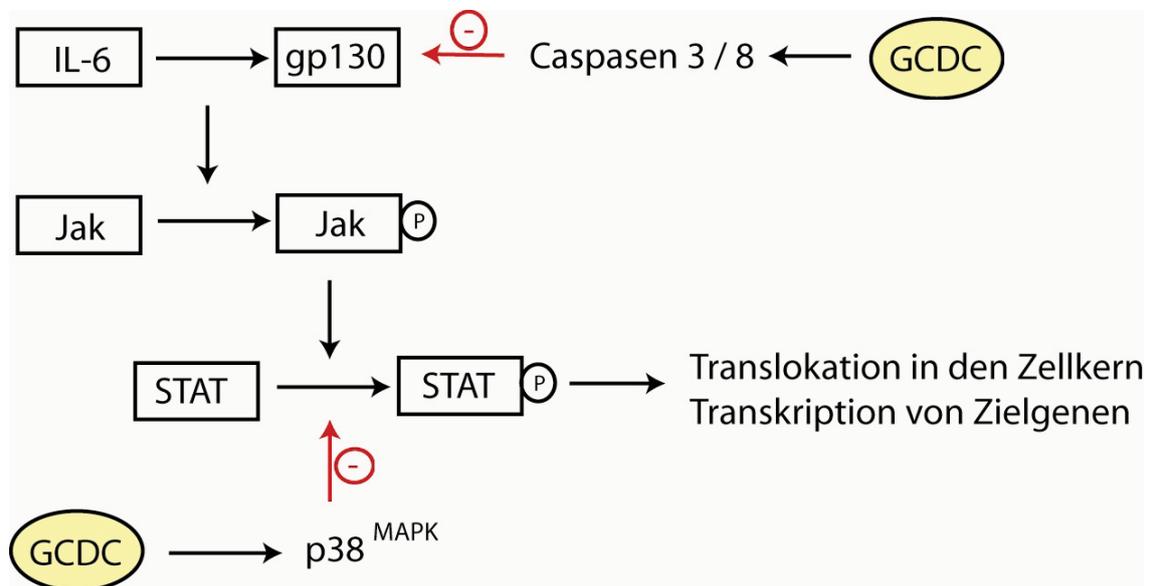
Es konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass hydrophobe, proapoptische Gallensäuren eine Abnahme der signaltransduzierenden Untereinheit des IL-6-Rezeptorkomplexes in Hepatozyten, NTCP-HepG2-Zellen sowie der Leberperfusion vermitteln. Die Herunterregulation von gp130 ist sensitiv gegenüber einer Inhibition der Caspase 3- und 8-Aktivität, so dass vermutet werden kann, dass gp130 ein Substrat von Caspasen ist; auch TUDC, als antiapoptisch wirkende Gallensäure, kann die durch GCDC induzierte Downregulation größtenteils verhindern.

Neben gp130 als Angriffspunkt sind hydrophobe Gallensäuren in der Lage, in Hepatozyten die Phosphorylierung des STAT3-Proteins (Tyr<sup>705</sup>) zu hemmen. Die Inhibition des Phosphorylierungsschrittes ist zumindest teilweise sensitiv gegenüber der Hemmung der p38<sup>MAPK</sup>. Die Hemmung der IL-6-induzierten STAT-Aktivierung durch Gallensäuren scheint

ein generelleres Phänomen zu sein, da neben STAT3 auch STAT1 von der Phosphorylierungsinhibition (Tyr<sup>701</sup>) betroffen ist.

Die Daten zeigen, dass hydrophobe, proapoptotische Gallensäuren das IL-6-Signalling auf verschiedenen Ebenen inhibieren. Einerseits induzieren sie eine Caspase-abhängige Abnahme des gp130, andererseits hemmen sie die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung via Aktivierung der p38<sup>MAPK</sup> (Abbildung 21).

Wir postulieren, dass Gallensäuren im Rahmen cholestatischer Syndrome hepatoprotektive Signalwege, wie z.B. das IL-6-Signalling, abschalten und dadurch, neben bekannten Mechanismen wie einer Apoptoseinduktion, die Hepatotoxizität triggern können.



**Abb. 21: Hypothetisches Schema der molekularen Mechanismen der Gallensäuren-induzierten Inhibition des Interleukin-6-Signalweges in der Leber**

Wir postulieren, dass pro-apoptotische Gallensäuren auf verschiedenen Ebenen das Interleukin-6-Signalling inhibieren können. Einerseits induzieren sie eine Downregulation des gp130 via einer Caspase-abhängigen Degradation des gp130, andererseits hemmen sie die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung via der p38<sup>MAPK</sup>.

## Literaturverzeichnis

1. Ahmed ST, Ivashkiv LB. Inhibition of IL-6 and IL-10 signalling and STAT activation by inflammatory and stress pathways. *J Immunol* 165: 5227-5237, 2000.
2. Alam A, Cohen LY, Aouad S, Sekaly RP. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med* 190: 1879-1890, 1999.
3. Andus T, Geiger T, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Action of recombinant human interleukin 6, interleukin 1  $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  on the mRNA induction of acute-phase proteins. *Eur J Immunol* 18: 739-746, 1988.
4. Auernhammer CJ, Bousquet C, Chesnokova V, Melmed S. SOCS proteins: modulators of neuroimmunoendocrine functions. Impact on corticotroph LIF signalling. *Ann N Y Acad Sci* 917: 658-664, 2000.
5. Auernhammer CJ, Melmed S. Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function. *Endocr Rev* 21: 313-345, 2000.
6. Bae SS, Choi JH, Oh YS, Perry DK, Ryu SH, Suh PG. Proteolytic cleavage of epidermal growth factor receptor by caspases. *FEBS Lett* 491: 16-20, 2001.
7. Barton BE. The biological effects of interleukin-6. *Med Res Rev* 16: 87-109, 1996.
8. Bergasa NV. The pruritus of cholestasis. *J Hepatol* 43: 1078-1088, 2005.
9. Blanchard F, Wang Y, Kinzie E, Duplomb L, Godard A, Baumann H. Oncostatin M regulates the synthesis and turnover of gp130, leukemia inhibitory factor receptor alpha, and oncostatin M receptor beta by distinct mechanisms. *J Biol Chem* 276: 47038-47045, 2001.
10. Blindenbacher A, Wang X, Langer I, Savino R, Terracciano L, Heim MH. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 38: 674-682, 2003.
11. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15: 725-731, 2003.
12. Bode JG, Fischer R, Häussinger D, Graeve L, Heinrich PC, Schaper F. The inhibitory effect of IL-1 $\beta$  on IL-6 induced  $\alpha_2$ -macroglobulin expression is due to activation of NF- $\kappa$ B. *J Immunol* 167: 1469-1481, 2001.

13. Bode JG, Ludwig S, Freitas CA, Schaper F, Ruhl M, Melmed S et al. The MKK6/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is capable of inducing SOCS3 gene expression and inhibits IL-6-induced transcription. *Biol Chem* 382: 1447-1453, 2001.
14. Bode JG, Nimmesgern A, Schmitz J, Schaper F, Schmitt M, Frisch W et al. LPS and TNF- $\alpha$  induce SOCS3 mRNA and inhibit IL6-induced activation of STAT3 in macrophages. *FEBS Lett* 463: 365-370, 1999.
15. Bode JG, Schweigart J, Kehrmann J, Ehltling C, Schaper F, Heinrich PC, Häussinger D. TNF- $\alpha$  induces tyrosine phosphorylation and recruitment of the Src homology protein-phosphatase 2 to the gp130 signal-transducing subunit of the IL-6 receptor complex. *J Immunol* 171: 257-266, 2003.
16. Borgstrom, B. Bile salts—their physiological functions in the gastrointestinal tract. *Acta Med Scand* 196: 1-10, 1974.
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
18. Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S. Receptors that mediate cellular dependence. *Cell Death Differ* 12: 1031-1043, 2005.
19. Chen J, Kunos G, Gao B. Ethanol rapidly inhibits IL-6-activated STAT3 and C/EBP mRNA expression in freshly isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett* 457: 162-168, 1999.
20. Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P et al. Specific inhibition of STAT3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278: 1803-1805, 1997.
21. Cisowski J, Zarebski A, Koj A. IL-1-mediated inhibition of IL-6-induced STAT3 activation is modulated by IL-4, MAP kinase inhibitors and redox state of HepG2 cells. *Folia Histochem Cytobiol* 40: 341-345, 2002.
22. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 274: 1379-1383, 1996.
23. Degtarev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene* 22: 8543-8567, 2003.
24. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387: 921-924, 1997.
25. Ezure T, Skamoto T, Tsuji H, Lunz JG, Murase N, Fung JJ, Demetris AJ. The development and compensation of biliary cirrhosis in interleukin-6-deficient mice. *Am J Pathol* 156: 1627-1639, 2000.

26. Fadok VA, Bratton D, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RAB, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405: 85-90, 2000.
27. Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, Kaufmann SH, Gores GJ. Toxic bile salts reduce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* 103: 137-145, 1999.
28. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10: 76-100, 2003.
29. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-260, 1998.
30. Gibson RM, Schiemann WP, Prichard LB, Reno JM, Ericsson LH, Nathanson NM. Phosphorylation of human gp130 at Ser-782 adjacent to the di-leucine internalization motif. *J Biol Chem* 275: 22574-22582, 2000.
31. Graeve L, Korolenko TA, Hemmann U, Weiergraber O, Dittrich E, Heinrich PC. A complex of the soluble interleukin-6 receptor and interleukin-6 is internalized via the signal transducer gp130. *FEBS Lett* 399 (1-2): 131-134, 1996.
32. Graf D, Bode JG, Häussinger D. Caspases and receptor cleavage. *Arch Biochem Biophys* 462: 162-170. 2007.
33. Graf D, Kurz AK, Fischer R, Reinehr R, Häussinger D. Taurolithocholic acid-3 sulfate induces CD 95 trafficking and apoptosis in a c-Jun N-terminal kinase dependent manner. *Gastroenterology* 122: 1411-1427, 2002.
34. Graf D, Reinehr R, Kurz AK, Fischer R, Häussinger D. Inhibition of taurolithocholate 3-sulfate-induced apoptosis by cyclic AMP in rat hepatocytes involves protein kinase A-dependent and -independent mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 415: 34-42, 2003.
35. Häussinger D, Kurz AK, Wettstein M, Graf D, vom Dahl S, Schliess F. Involvement of integrins and Src in tauroursodeoxycholate-induced and swelling-induced cholestasis. *Gastroenterology* 124: 1476-1487, 2003.
36. Häussinger D, Saha N, Hallbrucker C, Lang F, Gerok W. Involvement of microtubules in the swelling-induced stimulation of transcellular taurocholate transport in perfused rat liver. *Biochem J* 291: 355-360, 1993.
37. Haspel RL, Salditt-Georgieff M, Darnell JE Jr. The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated STAT1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *EMBO J* 15: 6262-6268, 1996.

38. He YY, Huang JL, Gentry JB, Chignell CF. Epidermal growth factor receptor down-regulation induced by UVA in human keratinocytes does not require the receptor kinase activity. *J Biol Chem* 278: 42457-42465, 2003.
39. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986-994, 1996.
40. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type signalling and its regulation. *Biochem J* 374: 1-20, 2003.
41. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776, 2000.
42. Hideshima T, Chauhan D, Hayashi T, Akiyama M, Mitsiades N, Mitsiades C et al. Proteasome inhibitor PS-341 abrogates IL-6 triggered signalling cascades via caspase-dependent downregulation of gp130 in multiple myeloma. *Oncogene* 22: 8386-8393, 2003.
43. Higuchi H, Gores GJ. Bile acid regulation of hepatic physiology IV. Bile acids and death receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: 734-738, 2003.
44. Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL family of cytokine receptors. *Oncogene* 19: 2548-2556, 2000.
45. Hof P, Pluskey S, Dhe-Paganon S, Eck MJ, Shoelson SE. Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell* 92: 441-450, 1998.
46. Hong F, Wim WH, Tian Z, Jaruga B, Ishac E, Shen X, Gao B. Elevated interleukin-6 during ethanol consumption acts as potential endogenous protective cytokine against ethanol-induced apoptosis in the liver: involvement of induction of Bcl-2, and Bcl-x (L) proteins. *Oncogene* 21: 32-43, 2002.
47. Houten SM, Watanabe M, Auwerx J. Endocrine functions of bile acids. *EMBO J* 25: 1419-1425, 2006.
48. Jain N, Zhang T, Fong SL, Lim CP, Cao X. Repression of STAT3 activity by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Oncogene* 17: 3157-3167, 1998.
49. Jones BA, Rao YP, Stravitz RT, Gores GJ. Bile salt-induced apoptosis of hepatocytes involves activation of protein kinase C. *Am J Physiol* 272: G1109-1115, 1997.
50. Kim TK, Maniats T. Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273: 1717-1719, 1996.

51. Kimmings AN, van Deventer SJ, Obertop H, Rauws EA, Huibregtse K, Gouma DJ. Endotoxin, cytokines, and endotoxin binding proteins in obstructive jaundice and after preoperative biliary drainage. *Gut* 46: 725-731, 2000.
52. Kimura F, Miyazaki M, Suwa T, Sugiura T, Shinoda T, Itoh H, Ambiru S, Shimizu H, Nakagawa K. Serum interleukin-6 levels in patients with biliary obstruction. *Hepatology* 46: 1613-1617, 1999.
53. Kong F, Guo X, Noel JG, Wells DA, Lovell GJ, Ogle CK. Thermal injury-induced increases of hepatocyte SOCS3 lead to decreases in STAT3. *Shock* 18: 374-379, 2002.
54. Kovalovich K, DeAngelis RA, Li W, Furth EE, Ciliberto G, Taub G. Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6 deficient mice. *Hepatology* 31: 149-159, 2000.
55. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789-795, 2000.
56. Krebs DL, Hilton DJ. Socs proteins: negative regulators of cytokine signalling. *Stem Cells* 19: 378-387, 2001.
57. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS: Physiological suppressors of cytokine signalling. *J Cell Sci* 113: 2813-2819, 2000.
58. Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Kubitz R, Schmitt M, Häussinger D, Stieger B et al. Stable expression and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting green fluorescent protein in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Cytotechnology* 34: 1-9, 2000.
59. Kullak-Ublick GA, Meier PJ. Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis* 4: 357-385, 2000.
60. Kurz AK, Block C, Graf D, vom Dahl S, Schliess F, Häussinger D. PI 3-kinase dependent Ras activation by tauroursodeoxycholate in rat liver. *Biochem J* 350: 207-213, 2000.
61. Kurz AK, Graf D, vom Dahl S, Schmitt M, Häussinger D. Tauroursodeoxycholate-induced choleresis involves p38<sup>MAPK</sup> activation and translocation of the bile salt export pump (Bsep) in rats. *Gastroenterology* 121: 407-419, 2001.
62. Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 14: 44-55, 2007.
63. Lang R, Heeg K. Semiquantitative determination of human cytokine mRNA expression using TaqMan RT-PCR. *Inflammopharmacology* 6: 297-309, 1998.

64. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115: 2665-2672, 2005.
65. Lehmann U, Schmitz J, Weissenbach M, Sobota RM, Hortner M, Friederichs K et al. SHP2 and SOCS3 contribute to Y-759-dependent attenuation of IL-6-signalling through gp130. *J Biol Chem* 278: 661-671, 2003.
66. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
67. Mann DV, Lam WW, Hjelm NM, So NM, Yeung DK, Metreweli C, Lau WY. Human liver regeneration: hepatic energy economy is less efficient when the organ is diseased. *Hepatology* 34: 557-565, 2001.
68. Mehlen P, Bredesen DE. The dependence receptor hypothesis. *Apoptosis* 9: 37-49, 2004.
69. Nakano H, Fujiwara Y, Kitamura N, Kumada K, Matsumiya A, Sakai H, Hatakeyama T, Yamaguchi M, Jack D. Susceptibility to lipopolysaccharide of cholestatic rat liver produced with bile duct ligation: assessments of the mitochondrial glutathione pool and the effects of N-acetylcysteine. *Eur Surg Res* 32: 148-154, 2000.
70. Narazaki M, Fujimoto M, Matsumoto T, Morita Y, Saito H, Kajita T, et al. Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signalling. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13130-13134, 1998.
71. Niemand C, Nimmegern A, Haan S, Fischer P, Schaper F, Rossaint R, Heinrich PC, Müller-Newen G. Different sensitivities of IL-10- and IL-6-induced STAT3 activation towards SOCS3 induction and other inhibitory mechanisms in primary human macrophages. *J Immunol* 170: 3263-3272, 2003.
72. Padillo FJ, Andicoberry B, Muntane J, Lozano JM, Mino G, Sitges-Serra A, Solorzano G, Pera-Madrado C. Cytokines and acute-phase response markers derangements in patients with obstructive jaundice. *Hepatogastroenterology* 48: 378-381, 2001.
73. Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human diseases. *Ann Intern Med* 128: 127-137, 1998.
74. Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, McClanahan TK et al. WSX-1 and glykoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 172: 2225-2231, 2004.

75. Quintanilla-Martinez L, Kremer M, Specht K, Calzada-Wack J, Natrath M, Schaich R, Hofler H, Fend F. Analysis of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway in multiple myeloma: STAT3 activation and cyclin D1 dysregulation are mutually exclusive events. *Am J Pathol* 162: 1449-1461, 2003.
76. Reinehr R, Becker S, Keitel V, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. Bile-salt induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation. *Gastroenterology* 129: 2009-2031, 2005.
77. Reinehr R, Becker S, Wettstein M, Häussinger D. Involvement of the Src family kinase yes in bile salt-induced apoptosis. *Gastroenterology* 127: 1540-1557, 2004.
78. Reinehr R, Graf D, Fischer R, Schliess F, Häussinger D. Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. *Hepatology* 36: 602-614, 2002.
79. Reinehr R, Häussinger D. CD95 activation in the liver: ion fluxes and oxidative signalling. *Arch Biochem Biophys* 462: 124-131, 2007.
80. Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med* 4: 165-178, 1998.
81. Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Differ* 6: 842-854, 1999.
82. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 80: 227-236, 2006.
83. Rose-John S, Waetzig GH, Scheller J, Grötzinger J, Seeger D. The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 11: 613-624, 2007.
84. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signalling pathways. *EMBO J* 17: 1675-1687, 1998.
85. Schliess F, Kurz AK, vom Dahl S, Häussinger D. Mitogen-activated protein kinases mediate the stimulation of bile acid secretion by tauroursodeoxycholate in rat liver. *Gastroenterology* 113: 1306-1314, 1997.

86. Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Pharmacol* 66: 1453-1458, 2003.
87. Sewnath ME, van der Poll T, van Noorden CJ, ten Kate FJ, Gouma DJ. Cholestatic interleukin-6-deficient mice succumb to endotoxin-induced liver injury and pulmonary inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 413-420, 2004.
88. Sibley DR, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ. Regulation of transmembrane signalling by receptor phosphorylation. *Cell* 48: 913-922, 1987.
89. Sies H. The use of perfusion of liver and other organs for the study of microsomal electron-transport and cytochrome P-450 systems. *Methods Enzymol* 52: 48-59, 1978.
90. Siewert E, Muller-Esterl W, Starr R, Heinrich PC, Schaper F. Different protein turnover of interleukin-6-type cytokine signalling components. *Eur J Biochem* 265: 251-257, 1999.
91. Sodeman T, Bronk SF, Roberts PJ, Miyoshi H, Gores GJ. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 278: G992-999, 2000.
92. Streetz KL, Tacke F, Leifeld L, Wuestefeld T, Graw A, Klain C, Kamino K, Kreipe H, Kubicka S, Muller W, Manns MP, Trautwein C. Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases. *Hepatology* 38: 218-229, 2003.
93. Streetz KL, Wuestefeld T, Klein C, Kallen KJ, Troche F, Betz UA, Schutz G, Manns MP, Muller W, Trautwein C. Lack of gp130 expression in hepatocytes promotes liver injury. *Gastroenterology* 125: 532-543, 2003.
94. Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med* 339: 1217-1227, 1998.
95. Van Cruchten S, van den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31: 214-223, 2002.
96. Vom Dahl S, Häussinger D. Experimental methods in hepatology. Guidelines of the German Association for the Study of the Liver (GASL). Liver perfusion-technique and applications. *Z Gastroenterol* 35: 221-226, 1997.
97. Wormald S, Hilton DJ. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* 279: 821-824, 2003.
98. Wuestefeld T, Klein C, Streetz KL, Beraza N, Scholmerich J, Burgart LZ et al. Lack of gp130 expression results in more bacterial infection and higher mortality during chronic cholestasis in mice. *Hepatology* 42: 1082-1090, 2005.

99. Wuestefeld T, Klein C, Streetz KL, Betz U, Lauber J, Buer J, Manns MP, Muller W, Trautwein C. Interleukin 6/glykoprotein 130-dependent pathways are protektive during liver regeneration. *J Biol Chem* 278: 11281-11288, 2003.
100. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 : 127-137, 2001.
101. Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprich E, Sokol RJ. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 33: 616-626, 2001.
102. Zhang Z, Fuller GM. The competitive binding of Stat3 and NF- $\kappa$ B on an overlapping DNA binding site. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 90-94, 1997.

## **Anhang**

### **Danksagung**

Mein erster und besonderer Dank gilt Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger für die Möglichkeit der Ausführung meiner Promotionsarbeit an seinem Institut. Insbesondere möchte ich ihm herzlich für die Überlassung des Promotionsthemas und für die Ermöglichung ausgezeichneter Arbeitsbedingungen danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Dirk Graf für die intensive Betreuung und Unterstützung im Labor sowie für die rege wissenschaftliche Diskussion bedanken. Seine Flexibilität, Zuverlässigkeit und die damit verbundene hervorragende Zusammenarbeit haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Frau MTA Verena Fuchs und Frau Diplom-Biologin Katrin Haselow danke ich für ihre Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung diverser Westernblots und PCR-Analysen sowie bei der Zellkultur. Sie standen mir bei Fragen jeglicher organisatorischer und fachlicher Art tatkräftig zur Seite.

Auch Herrn David Finis bin ich für die mit zeitlichem Aufwand verbundene Gestaltung der Abbildungen zu großem Dank verpflichtet.

# Lebenslauf

Anna Caroline Kohlmann

geb. am	22. Oktober 1982 in Köln
Eltern	Prof. Dr. Günter Kohlmann, Universitätsprofessor für Strafrecht und Strafprozessrecht Dr. Dorothea Kohlmann, geb. Schinkel, Diplom-Psychologin
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch
1988-1992	Katholische Grundschule Lindenburger Allee, Köln
1992-1998	Erzbischöfliches Gymnasium Liebfrauenschule, Köln
1998-1999	St. Bede's School, East Sussex, England
1999-2001	Städtisches Friedrich-Wilhelm-Gymnasium, Köln Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
2001-2008	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

## Abstract

Im Rahmen cholestatischer Syndrome akkumulieren hydrophobe Gallensäuren, die nach Aktivierung einer komplexen Signalkaskade eine hepatozelluläre Apoptose auslösen. Dies spielt eine zentrale Rolle für den Cholestase-bedingten Leberschaden.

In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass hydrophobe Gallensäuren die IL-6-vermittelte Signaltransduktion inhibieren. Im Wesentlichen wurden zwei Signalwege identifiziert, die die Gallensäuren-induzierte Hemmung der IL-6-Signalkaskade vermitteln.

Auf der einen Seite führen hydrophobe Gallensäuren zu einer Caspase-3 und -8 abhängigen Degradation der Signal-transduzierenden Untereinheit des IL-6-Rezeptorkomplexes gp130. Dies konnte mittels spezifischer Inhibitorstudien analysiert werden. Der gp130 besitzt intrazellulär im Bereich der Aminosäuren 800-806 ein potentielles Caspase-3 Cleavage-Motif, so dass der gp130 ein direktes Substrat der Caspase 3 sein könnte.

Zum anderen wird die IL-6-vermittelte STAT3-Phosphorylierung im Bereich des Tyrosins<sup>705</sup> durch Gallensäuren blockiert. Die Inhibition des Phosphorylierungsschrittes ist zumindest teilweise sensitiv gegenüber der Hemmung der p38<sup>MAPK</sup>. Neben der IL-6-induzierten STAT3-Aktivierung wird auch die IL-6-vermittelte STAT1-Phosphorylierung (Tyr<sup>701</sup>) blockiert.

Für Interleukin-6 konnte in der Vergangenheit eine hepatoprotektive Wirkung im Rahmen verschiedener akuter oder chronischer Leberschädigungsmodelle dargelegt werden. Zudem spielt Interleukin-6 eine wichtige Rolle für die Homöostase der Leber. Die Inhibition des Interleukin-6-Signalweges resultiert damit in einer vermehrten Sensitivität der Leber gegenüber toxischen Reizen. Damit konnte ein neuartiger molekularer Mechanismus identifiziert werden, wie Gallensäuren zu einer hepatozellulären Schädigung führen.