

**Modulation der hepatischen Akut-Phase-Reaktion und der
antiviralen Antwort durch pro-apoptotische Stimuli**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von
Katrín Haselow
aus Emsdetten**

Düsseldorf 2009

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. Johannes G. Bode

Koreferent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.09

Teilergebnisse wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

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**. 2006 Nov;44:1206-17

Graf D*, Haselow K*, Münks I, Bode JG, Häussinger D. Caspase-mediated cleavage of the signal-transducing IL-6 receptor subunit gp130. **Arch Biochem Biophys**. 2008 Sep, 477:330-8. *Autoren sind gleichermaßen an der Arbeit beteiligt gewesen

Tagungsbeiträge:

Katrin Haselow, Ivo Münks, Caroline Kohlmann, Johannes G. Bode, Dirk Graf und Dieter Häussinger (2007): Caspase-3 vermittelte Inhibition des IL-6-Signalweges (Posterpräsentation und Posterpreis für die beste Posterpräsentation); Abstract no 5.15. **GASL**, 23. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Göttingen

Dirk Graf, Katrin Haselow, Ivo Münks, Johannes G. Bode and Dieter Häussinger (2007): Gp130, the signal-transducing IL-6 receptor subunit, is a substrate of caspases (Posterpräsentation); Presidential Poster Abstract no 505. **AASLD**, 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston

Katrin Haselow (2008): Modulation of the hepatic acute phase reaction and antiviral response by proapoptotic stimuli (Vortrag); 4th International Conference of the Collaborative Research Center SFB 575 „Experimental Hepatology“ November 7th – 8th, 2008, Düsseldorf

Katrin Haselow, Ivo Münks, Johannes G. Bode, Dirk Graf und Dieter Häussinger (2009): Interferon- α (IFN- α) Resistenz durch Gallensäuren und hyperosmotischen Stress (Posterpräsentation); Abstract no P.2.13. **GASL**, 25. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Heidelberg

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Allgemeine Einführung und Fragestellungen.....	1
1.2 Funktionen und physiologische Relevanz von IL-6 und IL-6-Typ Zytokinen.....	2
1.3 Die Signalkaskade von IL-6	4
1.4 Physiologische Relevanz und Signaltransduktion von IFN- α	6
1.5 Negativ Regulatoren des Jak/STAT-Signalweges.....	7
1.6 Apoptose und Apoptose-induzierende Signalwege.....	9
1.7 Cholestase	11
1.8 Physiologische Relevanz von Gallensäuren und Gallensäuren-induzierte Apoptose	12
1.9 Zellvolumenhomöostase und die Bedeutung für die hepatozelluläre Apoptose	15
2. Material und Methoden.....	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Geräte	18
2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3 Reagenzien und Inhibitoren für die Zellkultur	19
2.1.4 Lösungen und Puffer	20
2.1.5 Kits	21
2.1.6 Antikörper	21
2.1.7 Oligonukleotide.....	22
2.1.8 Plasmide	23
2.1.9 Zelllinien	23
2.1.10 Medien und Zusätze für die Zellkultur.....	23
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2.1.1 Transformation von Bakterien.....	24
2.2.1.2 Kultivierung von Bakterien	24
2.2.1.3 Isolierung von Plasmid DNA aus E. coli.....	25
2.2.1.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	25
2.2.1.5 Restriktion von DNA.....	26
2.2.1.6 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	26
2.2.1.7 Isolierung von DNA aus Agarose.....	26
2.2.1.8 Ligation von DNA	26

2.2.1.9	Polymerase-Kettenreaktion	27
2.2.1.10	Amplifizierung und Mutagenese des chimären Rezeptors Epo-gp130	28
2.2.1.11	Reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR	29
2.2.1.12	Sequenzierung	29
2.2.2	Zellbiologische Methoden	30
2.2.2.1	Isolierung primärer Rattenhepatozyten	30
2.2.2.2	Isolierung von peripheren mononukleären Zellen	30
2.2.2.3	Kultivierung eukaryotischer Zellen	30
2.2.2.4	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen	31
2.2.3	Proteinanalytische Methoden	31
2.2.3.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	31
2.2.3.2	SDS-Page	32
2.2.3.3	Western-Blot Analyse	33
2.2.4	Immunzytochemie	33
2.2.5	<i>In vitro</i> gp130-Caspase Assay	34
2.2.6	Statistik	34
3.	Ergebnisse	35
3.1	Modulation der IL-6 Signaltransduktion durch pro-apoptotische Stimuli	35
3.1.1	Einfluss pro-apoptotischer Stimuli auf den IL-6 Signalweg	35
3.1.2	Caspase-vermittelte Degradation von gp130	38
3.2	Modulation der IFN- α -abhängigen Signaltransduktion und Expression antiviraler Proteine	45
3.2.1	Effekt von pro-apoptotischen Stimuli und Betain auf die IFN- α -induzierte Proteinexpression	45
3.2.2	Molekulare Mechanismen der hyperosmotisch-induzierten Inhibition der MxA-Transkription	52
3.2.3	Einfluss pro-apoptotischer Stimuli auf die IFN- α -induzierte STAT1/2 Phosphorylierung	56
4.	Diskussion	59
4.1	Caspase-abhängige Modulation des IL-6 Signalweges	59
4.2	Einfluss von pro-apoptotischen Stimuli und Betain auf die antivirale Antwort	65
5.	Zusammenfassung	69
6.	Summary	70
7.	Literaturverzeichnis	71

8. Abkürzungsverzeichnis	85
9. Lebenslauf.....	89
10. Danksagung	90
11. Erklärung.....	91

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung und Fragestellungen

Sowohl für Einzeller als auch für Zellen eines multizellulären Organismus ist die Kommunikation mit der Umgebung und mit anderen Zellen unerlässlich. Von einer solchen Signalübertragung sind u.a. Zellwachstum, Zellteilung, Differenzierung und Apoptose abhängig. Oft dienen extrazelluläre Signalpeptide als Überträger von Informationen, die in den Empfängerzellen über Oberflächen-Rezeptoren und anschließende Signalkaskaden die Expression oder die Aktivierung bestimmter Proteine regulieren. Diese intrazellulären Signalkaskaden stehen häufig in Wechselwirkung mit weiteren Signalen, sodass ein komplexes Signal-Netzwerk entsteht.

Patienten mit einer Leberzirrhose und/ oder cholestatischen Syndromen weisen erhöhte Gallensäurenspiegel im Serum auf. Klinische Beobachtungen bestätigen, dass z.B. Patienten mit Hepatitis-C-Virus (HCV)-Infektion mit erhöhtem Gallensäurenspiegel im Serum schlechter auf eine Interferon (IFN)-Therapie ansprechen. Ebenso wird bei einer Entzündungsreaktion im Körper Interleukin-6 (IL-6) verstärkt exprimiert und sezerniert, sodass eine Modulation des IL-6 Signalweges durch pro-apoptotische Gallensäuren prinzipiell möglich erscheint.

In der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass hydrophobe Gallensäuren die IL-6-induzierte Phosphorylierung von STAT3 in Hepatozyten inhibieren und dies mit einer reduzierten Expression des IL-6 signalweiterleitenden Rezeptors gp130 einhergeht [1].

Diese Dissertation befasst sich mit den Signalwegen von Interleukin-6 (IL-6) und Interferon- α (IFN- α) und deren Modulation durch pro-apoptotische Stimuli wie hydrophobe Gallensäuren, hyperosmotischen Stress und CD95-Ligand. Es sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Vermitteln andere pro-apoptotische Stimuli einen ähnlich modulierenden Effekt auf das IL-6-Signalling wie Gallensäuren?
- Welcher Mechanismus vermittelt die Gallensäuren-induzierte Herabregulation des IL-6-Rezeptors gp130?

- Kann die Herabregulation des Rezeptors gp130 aufgehoben werden und lässt sich durch eine Stabilisierung des Rezeptors die IL-6-induzierte STAT3 Aktivierung wiederherstellen?
- Wird der IFN- α Signalweg ebenfalls durch pro-apoptotische Einflüsse moduliert und wenn ja, welche Signalelemente sind davon betroffen und wie kann dies verhindert werden?

1.2 Funktionen und physiologische Relevanz von IL-6 und IL-6-Typ Zytokinen

IL-6 ist ein pleiotrop wirkendes Zytokin mit einem Molekulargewicht von 26 kDa. Es ist entscheidend an der Regulation der Differenzierung, der Apoptose und der Proliferation [2-5] von Hepatozyten beteiligt. Außerdem reguliert es maßgeblich die Induktion der Akut-Phase-Antwort im Rahmen von Entzündungsprozessen und somit die hepatische Expression von Akut-Phase-Proteinen wie z.B. das C-reaktive Protein, α_2 -Makroglobulin, Fibrinogen, "tissue inhibitor of metalloproteinase-1" (TIMP1) und α_1 -Antichymotrypsin. Da IL-6 durch Entzündungsprozesse induziert wird und bei entzündlichen Erkrankungen die Serumkonzentration von IL-6 erhöht ist, galt es ursprünglich als pro-inflammatorisches Zytokin [2, 4, 6-8]. Pro-inflammatorische Eigenschaften sind neben der Induktion der Akut-Phase-Proteine z.B. die IL-6 induzierte Antikörperproduktion in B-Lymphozyten, die Aktivierung von T-Lymphozyten sowie die verstärkte Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen durch Endothelzellen [2, 7, 8]. Im Gegensatz dazu vermittelt IL-6 aber auch anti-inflammatorische Eigenschaften, wie die Induktion des entzündungshemmenden Zytokins IL-10 oder die Induktion von Protease-Inhibitoren [9, 10]. Ferner inhibiert es die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen wie TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-1 β und die Expression von Adhäsionsmolekülen [11-13]. IL-6 gilt somit sowohl als pro- als auch als anti-inflammatorisches Zytokin.

Während cholestatischer Syndrome werden Zytokine wie IL-6 und TNF- α verstärkt expremiert und sezerniert, sodass die Serumspiegel dieser Zytokine ansteigen [14-15]. Die Bedeutung von IL-6 für die hepatische Homöostase im Rahmen der Inflammation wird deutlich, wenn man Studien mit IL-6-Knockout-Mäusen betrachtet. Sie zeigen z.B. eine vermehrte Anfälligkeit gegenüber hepatotoxischen Substanzen wie Endotoxine oder im Rahmen einer Gallengangsobstruktion im BDL-Modell [16-17]. Des Weiteren zeigen diese Mäuse nach Schädigung der Leber durch CCl₄ eine vermehrte hepatozelluläre Schädigung,

eine verstärkte Apoptose-Rate und eine verminderte Regeneration der Hepatozyten. Ebenfalls wurde eine signifikant abgeschwächte Aktivierung von STAT3 und NF κ -B sowie eine reduzierte DNA-Synthese- und Mitose-Rate der Hepatozyten nachgewiesen [18]. Die Wirkung von IL-6 für die Leberregeneration ist umstritten. Nach einer partiellen Hepatektomie ist die Leberregeneration in IL-6-defizienten Tieren stark vermindert [19]. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass IL-6 nach einer partiellen Hepatektomie protektive Signalwege induziert ohne einen signifikanten Einfluss auf die Hepatozyten-Proliferation zu nehmen. Eine Überstimulation mit IL-6 führte sogar zur Inhibition der Hepatozyten-Proliferation [20, 21].

Eine hepatoprotektive Wirkung von IL-6 konnte auch an gp130 Knockout-Mäusen demonstriert werden. So zeigte sich, dass gp130 die Expression der Akut-Phase-Proteine reguliert und bei einer chronischen Cholestase vor bakterieller Überbesiedlung schützt. Nach einer partiellen Hepatektomie vermittelt gp130 die Aktivierung protektiver Signalwege, welche für die Leberregeneration essentiell sind. Bei chronischen Lebererkrankungen schützt IL-6 gp130-abhängig vor Progression einer Leberfibrose und einer hepatozellulären Schädigung [5, 20, 22, 23].

Gp130 vermittelt ebenfalls die Signalweiterleitung von anderen IL-6-Typ Zytokinen wie IL-11, LIF (leukemia inhibitory 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. Die Rezeptoruntereinheiten dieser Zytokine liegen entweder als Hetero- oder Homodimere vor. In allen Fällen ist mindestens ein gp130-Molekül beteiligt. IL-6, IL-11 und CNTF binden zuerst spezifisch an ihre entsprechenden α -Rezeptor-Untereinheiten, nur der Komplex des Zytokins und des α -Rezeptors rekrutiert hier die zweite Rezeptor-Untereinheit effektiv. IL-6 und IL-11 sind die einzigen IL-6-Typ-Zytokine, die das Signal über gp130-Homodimere 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 [3, 6].

IL-6 bindet an der Zelle an einem Rezeptor-Komplex, bestehend aus dem IL-6 spezifischen Rezeptor gp80 und der IL-6 signalweiterleitenden Untereinheit gp130. Der Rezeptor gp130 wird von allen Körperzellen expremiert, wohingegen gp80 vor allem in Hepatozyten, Neutrophilen, Monozyten/Makrophagen sowie anderen Leukozyten-Populationen expremiert wird. Zellen, die gp80 nicht expremieren, sprechen somit nicht auf IL-6 an. Es existiert jedoch noch ein alternativer Mechanismus für die Anbindung von IL-6 über das sogenannte Trans-Singalling. Hierbei bindet IL-6 an eine lösliche Form des IL-6-

Rezeptors gp80, der agonistisch an gp130 bindet und so die Signalkaskade in Zellen aktiviert, denen der membrangebundene Rezeptor gp80 fehlt. Hohe Spiegel von IL-6 und des löslichen Rezeptors gp80 wurden im Rahmen einer chronischen Inflammation, bei Autoimmunerkrankungen sowie Tumorerkrankungen beobachtet [24, 25]. Als natürlicher Inhibitor des Trans-Signallings existiert weiterhin eine lösliche Form der gp130 Rezeptoruntereinheit. Die Kombination der löslichen Rezeptoren gp80 und gp130 dient der Modulation IL-6-induzierter systemischer Reaktionen [3, 24, 25].

1.3 Die Signalkaskade von IL-6

Bei der Anbindung von IL-6 an die Zielzelle kommt es nach neuesten Erkenntnissen zur Ausbildung eines hexameren Komplexes, bestehend aus zwei Molekülen IL-6, zwei Molekülen des IL-6 spezifischen Rezeptors gp80 und zwei Molekülen der IL-6 signaltransduzierenden Untereinheit gp130 (vgl. Abb. 1.1) [2, 3]. Intrazellulär sind Tyrosin-Kinasen der Janus-Kinasen-Familie (Jak1/2) an gp130 konstitutiv assoziiert. Durch die Ausbildung des IL-6-Rezeptor-Komplexes werden die Kinasen in räumliche Nähe zueinander gebracht und es kommt zur Autophosphorylierung von Jak1/2. Die so aktivierten Janus-Kinasen phosphorylieren spezifische Tyrosinreste des gp130-Rezeptors. Die phosphorylierten Tyrosinreste 767, 814, 905, 915 sind verantwortlich für die Rekrutierung der *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-Elemente an gp130. Die STAT-Elemente werden ihrerseits von den Janus-Kinasen phosphoryliert und translozieren als aktivierte Homodimere in den Zellkern, um dort an Promotorelemente von Zielgenen zu binden. Zu den Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie zählen sieben Mitglieder (STAT1, -2, -3, -4, -5a, -5b und 6), welche mit Ausnahme von STAT4 ubiquitär exprimiert werden. Die Aktivität der STAT-Elemente wird vor allem durch Phosphorylierung von spezifischen Serin- und Tyrosinresten vermittelt. Die IL-6-Stimulation führt gp130/Jak1-vermittelt zur Phosphorylierung von STAT3 (Tyrosin⁷⁰⁵), während die Phosphorylierung von STAT1 (Tyrosin⁷⁰¹) und STAT5 (Tyrosin^{694/699}) nur eine untergeordnete Rolle spielen [2, 26, 27]. Eine Phosphorylierung von STAT3 am Serin⁷²⁷ erhöht dabei vermutlich die transkriptionelle Aktivität [3].

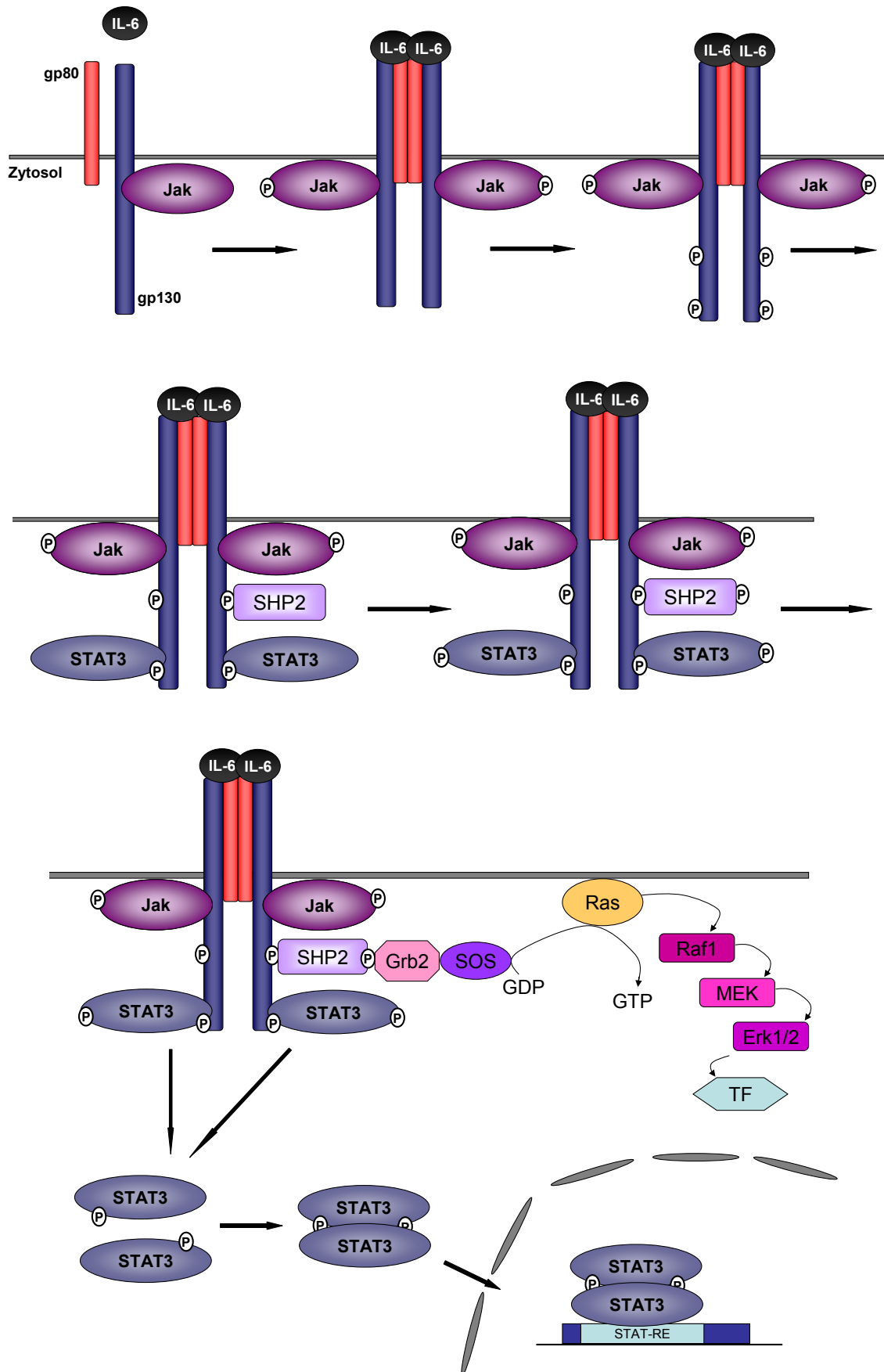


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der IL-6-induzierten Signaltransduktion

IL-6 vermittelt die Aktivierung der gp130/JAK/STAT Signalkaskade (modifiziert nach Häussinger et al. [28]).

IL-6 stimuliert parallel zu dem Jak/STAT-Signalweg den MAPK-Signalweg. Dabei erfolgt eine Rekrutierung der SHP2 (*SH2-domain-containing tyrosine phosphatase*) an die Rezeptoruntereinheit gp130. Die spezifische Phosphotyrosin-SH2-Domäne der SHP2 interagiert mit dem Tyrosin⁷⁵⁹ des gp130-Moleküls [27, 29-31]. Dies ist die gleiche Anbindungsstelle, an die auch SOCS3 (*suppressor of cytokine signalling 3*) bindet [32]. SOCS3 und SHP2 sind beide in der Lage, die durch IL-6 induzierte JAK-STAT-Signaltransduktion zu hemmen [3, 33, 34]. 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 (vgl. Abb. 1.1).

1.4 Physiologische Relevanz und Signaltransduktion von IFN- α

Interferone (IFN) vermitteln ein breites Spektrum an biologischen Aktivitäten und werden im Rahmen einer viralen Infektion induziert, um eine antivirale Antwort, Zellwachstum und die Immunabwehr zu regulieren [35-37]. Das IFN-System umfasst auf der einen Seite Zellen, die als Antwort auf einen externen Stimulus (z.B. Virus) IFN produzieren, und auf der anderen Seite Zellen, die auf IFN reagieren, um die antivirale Antwort auszulösen. Dabei können die IFN sowohl autokrine als auch parakrine Effekte bewirken. IFN werden im Allgemeinen in zwei Gruppen unterteilt: Typ I IFN werden auch als virale IFN bezeichnet und umfassen die verschiedenen Typen IFN- α , IFN- β , und IFN- ω . Zu Typ II IFN zählt nur IFN- γ [35]. Die Freisetzung von Typ I IFN, vor allem IFN- α , und die darauf folgende antivirale Antwort der Zelle, ist eine wichtige Strategie des Wirtes, sich gegen einen viralen Angriff zu schützen [38].

IFN- α wird hauptsächlich von Leukozyten produziert und sezerniert und vermittelt die biologische Aktivität hauptsächlich über den JAK/STAT Signaltransduktionsweg. An der Oberfläche der Zielzellen bindet IFN- α an einen Rezeptorkomplex, bestehend aus dem IFN- α -Rezeptor 1 (IFNAR1) und dem IFN- α -Rezeptor 2 (IFNAR2). Dabei ist der IFNAR1 konstitutiv mit der Januskinase Tyk2 assoziiert, während IFNAR2 mit Jak1 interagiert. Die Januskinasen werden durch die Anbindung des Liganden aktiviert und vermitteln nachfolgend die Phosphorylierung der im Zytoplasma vorliegenden STAT1 und STAT2 Elemente. Dies ist die Voraussetzung für die Ausbildung von aktivierten STAT1/STAT2 Heterodimeren, die ihrerseits mit p48, einem *interferon regulatory factor* (IRF), assoziieren. Dieser als *interferon-*

stimulated gene factor 3 (ISGF3) bezeichnete Komplex transloziert zum Nukleus und reguliert die Transkription von *interferon-stimulated genes* (ISG) durch Bindung an *interferon-stimulated response elements* (ISRE) [35-37].

IFN regulieren über den JAK/STAT Signaltransduktionsweg die Transkription von über 1000 verschiedenen Genen [39]. Darunter werden zahlreiche antivirale Proteine induziert, wie z. B. *Myxovirus resistance protein A* (MxA) [40], *dsRNA activated protein kinase* (PKR) [41] und *2'5'Oligoadenylatesynthetase* (OAS) [42], die die virale Replikation inhibieren, indem sie den Eintritt, die Freisetzung der viralen Nukleinsäuren aus der Kapsidhülle, die Transkription, die RNA-Stabilität, die Translation, die Reifung, die Ausbildung oder die Freisetzung des Virus beeinflussen [40-43].

Die OAS werden durch doppelsträngige (ds) RNA aktiviert und synthetisieren Oligoadenylate, die eine 2',5'-Phosphodiesterbindung enthalten. Diese bewirken wiederum eine Aktivierung der RNaseL, die zur Degradation der viralen und zellulären RNA führt [42].

Die PKR liegt als inaktives Protein in der Zelle vor und wird durch die Anbindung von dsRNA über Autophosphorylierung aktiviert. Die PKR phosphoryliert z.B. den Translationsinitiationsfaktor eIF-2- α , dieser initiiert einen kompletten Stopp der Translation und induziert parallel die Apoptose der Zelle [41].

Die Mx Proteine gehören zur Dynamin-Superfamilie der großen GTPasen. Mx GTPasen scheinen Nukleokapsid-ähnliche Strukturen zu erkennen und inhibieren sie, indem sie die Generierung neuer Virus-Partikel verhindern. Im Menschen werden zwei Mx GTPasen codiert: MxA und MxB. Beide sind im Cytoplasma lokalisiert, wobei bisher nur für MxA antivirale Eigenschaften nachgewiesen worden sind. Es wird vermutet, dass MxA unter anderem die Aktivität oder das „Trafficking“ der viralen Polymerasen inhibiert [40, 44].

1.5 Negativ Regulatoren des Jak/STAT-Signalweges

Die Stimulation einer Zelle durch ein Zytokin führt nicht immer zu der gleichen Reaktion. Intrazelluläre Vorgänge können parallel durch andere Faktoren beeinflusst werden. Für die Modulation des Zytokinsignals über den Jak/STAT-Signalweg sind verschiedene Mechanismen beschrieben, die größtenteils inhibierend wirken [45, 46] (vgl. auch Abb. 1.2). Modulierend eingreifende Signalelemente sind z.B. *supressors of cytokine signalling* (SOCS), *src homology protein tyrosine phosphatase 2* (SHP2) und *protein inhibitors of activated STATs* (PIAS).

SOCS hemmen den Jak/STAT-Signalweg wesentlich über die Anbindung an den Rezeptor gp130 (Tyr⁷⁵⁹) [33, 34, 45-49]. Mitglieder der SOCS-Familie besitzen eine zentrale SH2-Domäne und eine C-terminale Domäne, die SOCS box, über die hauptsächlich die inhibierende Aktivität auf die Jak vermittelt wird. SOCS1 und SOCS3 inhibieren hauptsächlich die Kinase-Aktivität der 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 [50]. SOCS-Proteine sind klassische *Feedback*-Inhibitoren, da sie selbst durch die Stimulation mit den Zytokinen aktiviert werden, deren Signalkaskade sie hemmen [48, 51].

Die Protein-Tyrosin Phosphatase SHP2 übt neben ihrer aktivierenden Wirkung auf den MAPK-Signalweg auch eine inhibierende Funktion auf den Jak/STAT-Signalweg aus [32, 45, 46, 48]. Sie dephosphoryliert die Proteine Tyk2, Jak1 und Jak2 und vermindert so die IL-6-induzierte biologische Aktivität. Nukleäre Phosphatasen (TC-PTP) dephosphorylieren und inaktivieren so die aktivierten STAT-Elemente [52].

Zur Familie der PIAS zählen neben den für den STAT-Signalweg wichtigen PIAS1 und PIAS3 auch PIASx α , PIASx β und PIASy. Sie hemmen den Jak/STAT-Signalweg, indem sie an Tyrosinphosphorylierte STAT-Elemente binden und so deren DNA-Bindungsfähigkeit verringern [45, 46, 48, 53].

Das Proteasom trägt ebenfalls über den Abbau von STAT-Elementen zur Inaktivierung des Jak/STAT-Signalweges bei. Des Weiteren können Expressionsveränderungen der STATs den Signalweg beeinflussen [54]. Für andere Zytokine (IL-1 β , TNF- α) und Lipopolysaccharid (LPS) ist ebenfalls ein inhibierender Effekt auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion gezeigt worden [55, 56]. Auch Ethanol kann die IL-6-induzierte STAT3-Aktivierung und die IL-6 abhängige "CCAAT enhancer binding protein" (C/EBP)-Expression via Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) blockieren [57].

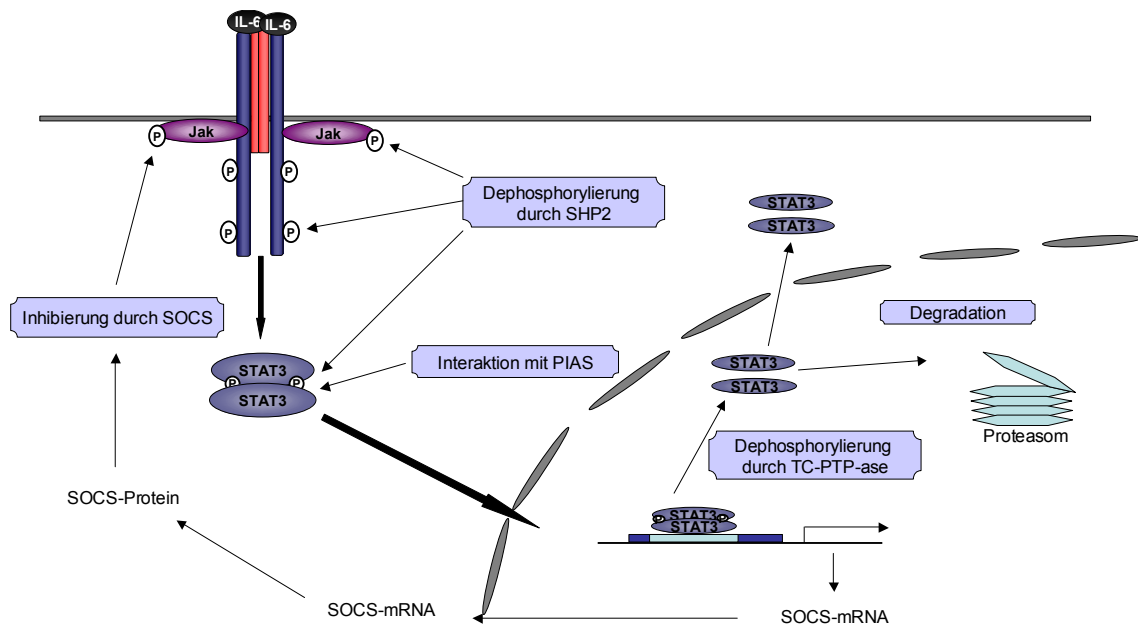


Abb. 1.2: Terminierung des IL-6-Signalweges

Darstellung der Interleukin-6-Signalterminierung durch SOCS, PIAS und Phosphatasen, nähere Erläuterungen im Text (modifiziert nach Heinrich et al. [3]).

1.6 Apoptose und Apoptose-induzierende Signalwege

Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod und ist für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase essentiell. Nur so können überschüssige oder funktionell fehlerhafte Zellen gezielt und kontrolliert entfernt werden. Die Apoptose ist charakterisiert durch Fragmentierung der DNA, Chromatin-Kondensation, Abbau des Zytoskeletts, Zellschrumpfung und Ausbildung von membranumschlossenen Vesikeln, den sogenannten *apoptotic bodies*, in denen DNA-Fragmente und restliche Zellorganellen enthalten sind [58]. Dies dient dem gerichteten Abbau der Zellbestandteile, die von umliegenden Zellen und Makrophagen phagozytiert werden, um eine Entzündungsreaktion zu vermeiden [59-62].

Eine entscheidende Rolle bei der Degradation der Zellbestandteile, der DNA-Kondensation und der Fragmentierung des Zellkerns spielen die Cystein-Aspartat-Proteasen (Caspasen). Sie verweilen als inaktive Vorstufen (Pro-Caspasen) im Cytoplasma und werden durch proteolytische Spaltung (*Cleavage*) aktiviert. Die Dimerisierung von zwei Pro-Caspasen resultiert in der gegenseitigen Abspaltung der Pro-Domänen. Aktivierte Caspasen können ihrerseits andere Caspasen spalten und verstärken so ihren eigenen Mechanismus [63-65]. Caspasen gehören zur Familie der Cystein-Proteasen und erkennen in ihrem Substrat ein sich über vier Aminosäuren erstreckendes Motiv, bezeichnet als P4-P3-P2-P1. Die Caspase-vermittelte Spaltung findet gewöhnlich hinter dem C-terminalen Rest (P1) statt, welches

meist ein Aspartat ist [66, 67]. Die Effektor-Caspasen erkennen und spalten verschiedene Substrate, vor allem Zellstrukturproteine (Aktin, Vimentin), Transkriptionsfaktoren, Zellzyklus regulierende Proteine (Cyklone) sowie Proteine, die in die Reparatur und Synthese der DNA involviert sind wie z.B. PARP (Poly ADP-Ribose-Polymerase) [63, 64, 66, 68].

Auf molekularer Ebene gibt es zwei wesentliche Signalwege, die zu einer Apoptose führen. Der extrinsische Signalweg wird durch die Anbindung von Liganden an sogenannte Todes-Rezeptoren initiiert, während zytotoxische Substanzen oder DNA-Schäden den intrinsischen Signalweg aktivieren. Beide Mechanismen führen zur Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 [69] und sind schematisch in Abb. 1.3 dargestellt.

Todes-Rezeptoren gehören zur Tumornekrosefaktor (TNF)-Superfamilie und lösen eine apoptotische Signalkaskade aus. Zu den Todes-Rezeptoren zählen CD95, TNF-Rezeptor 1 und 2, *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL)-Rezeptor 1, 2, 3 und 4 [70, 71]. Die Anbindung ihrer Liganden bewirkt die Polymerisierung gleichartiger Rezeptormoleküle und induziert intrazellulär die Ausbildung eines Apoptose-auslösenden Komplexes. Bindet z. B. CD95-Ligand an den CD95-Rezeptor, kommt es zur Trimerisierung des Rezeptors, gefolgt von der Rekrutierung des Adaptermoleküls *Fas-associated death domain* (FADD) an die sogenannte Todesdomäne des Rezeptors (*death domain*, DD; vgl. Abb. 1.3). FADD besitzt neben einer C-terminalen Todesdomäne eine Todeseffektordomäne am N-Terminus [72]. Über die beiden Todesdomänen von FADD und CD95 können die beiden Proteine assoziieren. An die Todeseffektordomäne lagern sich Pro-Caspase 8 und/ oder Pro-Caspase 10 an. Der Komplex wird nun als *death-inducing signalling complex* (DISC) bezeichnet. Innerhalb des DISC kommt es zu einer Dimerisierung der Pro-Caspasen (8 und 10), so dass die Pro-Domänen der Caspasen abgespalten werden und eine Aktivierung stattfindet. Aktive Caspase 8 führt über die proteolytische Spaltung von *Bcl-2-interacting protein* (Bid) auch zu der wie im Folgenden beschriebenen mitochondrialen Amplifikation des Apoptose-Signals [73, 74].

Ausgelöst durch zellulären Stress, wird bei dem intrinsischen Signalweg die Apoptose-Induktion über eine mitochondriale Dysfunktion vermittelt. Verschiedene zytotoxische Stimuli wie Chemikalien (z.B. Staurosporin, Dexamethason), Zytostatika oder DNA-Schäden vermitteln die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium ins Cytosol (vgl. Abb. 1.3). Die Aktivierung pro-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bax und Bak erhöhen den intrazellulären Spiegel an Calcium, Stickstoffmonoxid (NO) und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche die mitochondriale Membranpermeabilität

weiterhin erhöhen. Cytochrom C kann aufgrund dieser erhöhten Membranpermeabilität verstärkt freigesetzt werden und es kommt zur Ausbildung des sogenannten Apoptosoms [75, 76], bestehend aus Cytochrom C, Apaf-1 (Apoptose-Protease aktivierender Faktor) und ATP. Zusätzlich lagern sich Monomere der Pro-Caspase 9 an, die aufgrund der räumlichen Nähe nun Dimere ausbilden und sich durch die Abspaltung der Pro-Domänen [63, 69] aktivieren. Aktive Caspase 9 führt folglich zum Cleavage und somit zur Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7.

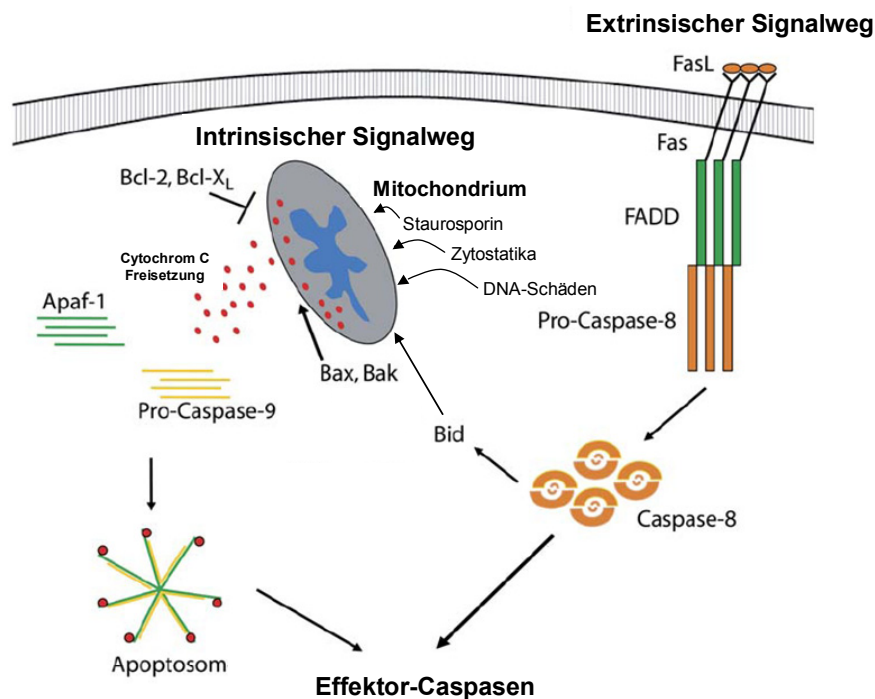


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Signalweges der Apoptose-Induktion

Entnommen und modifiziert nach Schafer & Kornbluth [77].

1.7 Cholestase

Die Cholestase ist durch ein erhöhtes hepatozelluläres Level an toxischen Gallensäuren gekennzeichnet und kann extra- oder intrahepatisch bedingt sein. Die intrahepatische Cholestase wird durch eine gestörte Gallensäuresekretion der Hepatozyten hervorgerufen. Ursache können hier die Membraneigenschaften der Hepatozyten, eine Funktionsstörung der in den Hepatozyten befindlichen Organellen oder eine gestörte Aktivität der Gallensäuren-Transporter sein. Hingegen wird die extrahepatische Cholestase durch eine Blockade des Gallengangsystems hervorgerufen, dies können z.B. Gallensteine, Tumore oder

Entzündungen der Gallenwege sein [78]. Die Mechanismen der Gallensäuren-induzierten Leberschädigung können anhand von *in-vivo* Modellen wie der Gallengangsligatur im Maus-Modell untersucht werden. Die Toxizität der Gallensäuren ist dabei abhängig von den hydrophoben Wechselwirkungen, der Konjugationsart sowie der Konzentration der Gallensäuren. *In vitro* und *in vivo* Studien haben gezeigt, dass die Apoptose von Hepatozyten ein vorherrschendes Merkmal der cholestatischen Lebererkrankung ist [79-82]. Bei einer über mehrere Monate anhaltenden Cholestase kann es zu einer portalen Hypertonie, einer Abnahme der Leberfunktion und zu einer biliären Fibrose kommen, die sich bis zu einer Zirrhose entwickeln kann. Für die Behandlung von cholestatischen Lebererkrankungen wird zunehmend Ursodeoxycholsäure (UDCA) eingesetzt. Dabei scheinen die drei Mechanismen (1) Schutz der Cholangiozyten gegenüber den toxischen Eigenschaften hydrophober Gallensäuren; (2) Stimulation der hepatobiliären Sekretion; (3) Schutz der Hepatozyten gegenüber Gallensäuren-induzierter Apoptose [83] eine wichtige Rolle zu spielen.

1.8 Physiologische Relevanz von Gallensäuren und Gallensäuren-induzierte Apoptose

Gallensäuren stellen als Sekretionsprodukte der Leber einen wesentlichen Bestandteil der Gallenflüssigkeit dar. Sie sind physiologische Detergentien und ihre Funktion besteht vornehmlich in der Emulgierung von Fetten [84, 85]. Durch die Ausbildung von Micellen können sie nicht nur Lipide und Cholesterine, sondern auch Lipovitamine und hydrophobe Pharmaka solubilisieren. Gallensäuren werden der Stoffklasse der Steroide zugeordnet und weisen in ihrer chemischen Struktur neben einem hydrophoben Kern (Steroidkern und Methylgruppen) auch hydrophile Elemente (Carboxyl- und Hydroxylgruppen) auf. Die Biosynthese der Gallensäuren findet ausschließlich in den Leberparenchymzellen statt. Ausgehend von dem Substrat Cholesterin, entstehen durch das Hinzufügen einer Carboxylgruppe sowie von Hydroxylgruppen die primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodeoxycholsäure. Unkonjugierte Derivate der Gallensäuren können an der Carboxylgruppe der Seitenkette über eine Amidbindung mit Glycin oder Taurin konjugiert werden und erhalten so hydrophile Eigenschaften, welche die Micellenbildung fördern. Nach Exkretion der Gallensäuren in die Galleflüssigkeit gelangen sie durch die ableitenden Gallenwege ins Duodenum. Unkonjugierte Gallensäuren werden im Colon durch passiven Transport wieder aufgenommen, während konjugierte Gallensäuren im terminalen Ileum

durch aktive und passive Mechanismen resorbiert werden. Über 90 % der sezernierten Gallensäuren werden so wieder zurückgewonnen und, gebunden an Albumin oder in Lipoproteinen, über das Pfortaderblut zur Leber zurückgeführt.

Nachweislich können Gallensäuren als Signalelemente mit endokrinen Funktionen wirken [85, 86]. Abhängig von ihren biochemischen Eigenschaften beeinflussen sie eine Reihe an Proteinkinasen [87-90] oder aktivieren nukleäre Hormonrezeptoren, wie z.B. den *farnesoid-X-receptor* (FXR) [91, 92]. Aufgrund ihrer Wirkung als Detergentien können Gallensäuren in hohen Konzentrationen die Zellmembran zerstören. Geringe Serumkonzentrationen an hydrophoben Gallensäuren vermitteln toxische Effekte, wohingegen hydrophile Gallensäuren eher protektive Eigenschaften besitzen [79, 90, 93-96]. In der Leber können hydrophobe Gallensäuren sowohl Nekrose als auch Apoptose induzieren [90, 94-97]. Bei cholestatischen Lebererkrankungen kann es zu einer Akkumulation von hydrophoben Gallensäuren kommen, die bei einer längerfristigen Exposition eine irreversible Schädigung und eine Leberzirrhose nach sich ziehen. Hierbei gilt die Apoptose als ein entscheidender Faktor [97, 98]. Hydrophobe Gallensäuren wie Glycochenodeoxycholsäure (GCDC), Taurochenodeoxycholsäure (TCDC) oder Tauroolithocholsäure-3-Sulfat (TLCS) lösen in Hepatozyten eine Apoptose aus. Dieser Mechanismus wird durch eine Liganden-unabhängige Aktivierung des CD95-Rezeptors vermittelt und aktiviert die Caspasen 3, 8 und 9 [79, 90, 94-96, 99-101].

Die Stimulation mit hydrophoben Gallensäuren aktiviert eine saure Sphingomyelinase, die eine Erhöhung des intrazellulären Ceramidgehaltes bewirkt (vgl. Abb. 1.4). Ceramide aktivieren die Proteinkinase C (PKC) ζ , welche die regulatorische p47^{phox}-Untereinheit der Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase phosphoryliert. Durch Konformationsänderungen kommt es zur Anlagerung weiterer Untereinheiten an die p47^{phox} und zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Im Folgenden kommt es zur ROS-vermittelten Aktivierung der Src-Familien-Kinase Yes sowie zu einer langanhaltenden Aktivierung der JNK1/2 [90, 94, 95, 102]. Die Yes-Kinase assoziiert daraufhin mit dem *Epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptor und aktiviert diesen über Tyrosinphosphorylierung. Die beiden Proteine dissoziieren wieder und der EGF-Rezeptor bildet JNK-vermittelt ein Heterodimer mit CD95. Zwei Tyrosinreste (Tyr²³² und Tyr²⁹¹) innerhalb der Todesdomäne von CD95 werden nun phosphoryliert, welches eine notwendige Bedingung für die Mikrotubuli-abhängige Membrantranslokation des CD95/EGF-Rezeptor-Proteinkomplexes und die anschließende Formation des DISC ist [90, 94, 95, 102]. Die so aktivierte Initiator-Caspase 8 spaltet Bid, das zum Mitochondrium transloziert, die mitochondriale Amplifikation

des Apoptosesignals und letztlich die Apoptose induziert (vgl. 1.6.1). Neben der Translokation von CD95 an die Plasmamembran induzieren Gallensäuren auch eine vermehrte Expression des TRAIL2-Rezeptors und die Suppression von cFLIP, eines anti-apoptotischen Proteins, das über die Modulation des Todes-Rezeptors wirkt [103]; auch eine direkte Toxizität der Gallensäuren auf die Mitochondrien führt zu einer Verstärkung der apoptotischen Signalkaskade [104, 105].

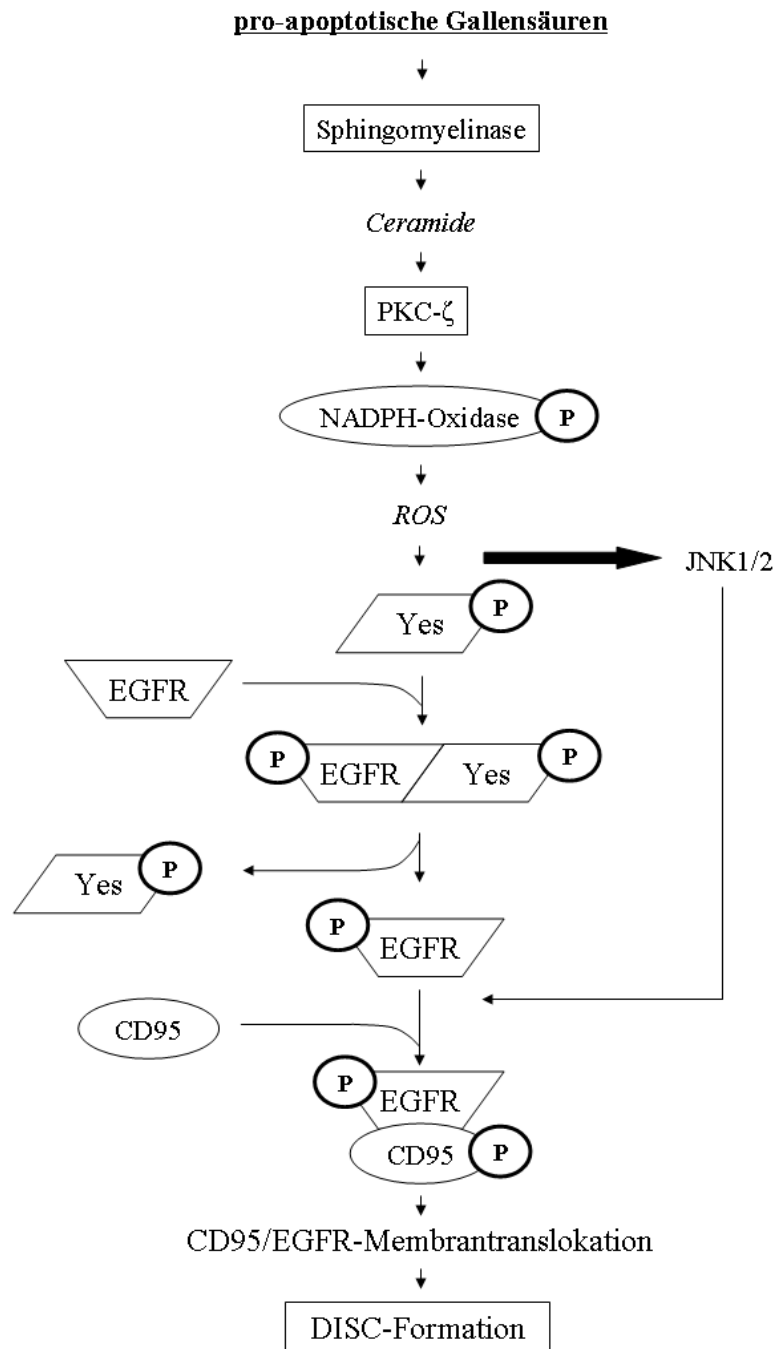


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Gallensäuren-induzierten Signaltransduktion und DISC-Formation (Nach Reinehr et al. [94])

1.9 Zellvolumenhomöostase und die Bedeutung für die hepatozelluläre Apoptose

Der Hydratationszustand der Zelle ist dynamisch. Binnen Minuten können sich Zellen an Veränderungen der umgebenden Osmolarität anpassen und regulieren dabei initial ihr Zellvolumen, d.h. sie schrumpfen oder schwellen [106-109]. Die zelluläre Hydratation wird durch Anisoosmolarität, Hormone, Nährstoffe und oxidativen Stress beeinflusst [110]. Die Zellschwellung und Zellschrumpfung vermittelt Signale, die Metabolismus und Genexpression der Zelle regulieren (Osmosignalling). Regulativ auf das osmotische Schrumpfen (unter hyperosmotischen Bedingungen) kommt es zur Aufnahme von gelösten Stoffen und Wasser, was wiederum zu einer Volumenzunahme führt (*regulatory volume increase*, RVI). Hingegen werden bei der Zellschwellung (unter hypoosmotischen Bedingungen) Systeme aktiviert, die gelöste Stoffe und Wasser ausscheiden, der sogenannten regulatorischen Volumenabnahme (*regulatory volume decrease*, RVD) [107, 111-114]. Allerdings stellen RVD und RVI das Ausgangsvolumen der Hepatozyten nicht vollständig wieder her, sodass sich dies in Veränderungen der Zellfunktion auswirkt. Allgemein zusammengefasst lässt sich für die osmotisch bedingte Zellschwellung eine Förderung der anabolen Stoffwechselprozesse und Proliferation feststellen, während die Zellschrumpfung den Katabolismus fördert, eine Insulinresistenz vermittelt und die Zelle für apoptotische Signale sensibilisiert [107-117].

Durch isoosmotischen Austausch von Ionen gegen kompatible organische Osmolyte erfolgt eine Langzeitadaptation. Organische Osmolyte sind Moleküle, wie z.B. Betain, Taurin und Myoinositol, die auch in hohen Konzentrationen die Funktionen der Makromoleküle nicht beeinflussen [118-119]. Der Mechanismus zur intrazellulären Anreicherung von Osmolyten beeinflusst nicht nur den Hydratationszustand der Zelle, er wirkt auch zytoprotektiv und erhöht die Toleranz gegenüber Stressfaktoren. Sie können z.B. als Antioxidantien oder als chemische Chaperone wirken [120-122]. Im Zusammenhang mit der Leber ist den Osmolyten eine hepatoprotektive Wirkung nachgewiesen worden. So vermindert z.B. Taurin den in Ratten durch Ethanol induzierten oxidativen Stress und reduziert eine hepatische Steatosis [123]. Weiterhin wurden für Taurin protektive Effekte im Modell der Ischämie/ Reperfusion der Leber nachgewiesen, wodurch die Organschädigung abgeschwächt wird [121, 124-126]. Für Betain wurde gezeigt, dass es die durch Gallensäuren-induzierte Apoptose in der Rattenleber inhibiert [127] und die durch Alkohol-induzierten Leberschäden abschwächt [128].

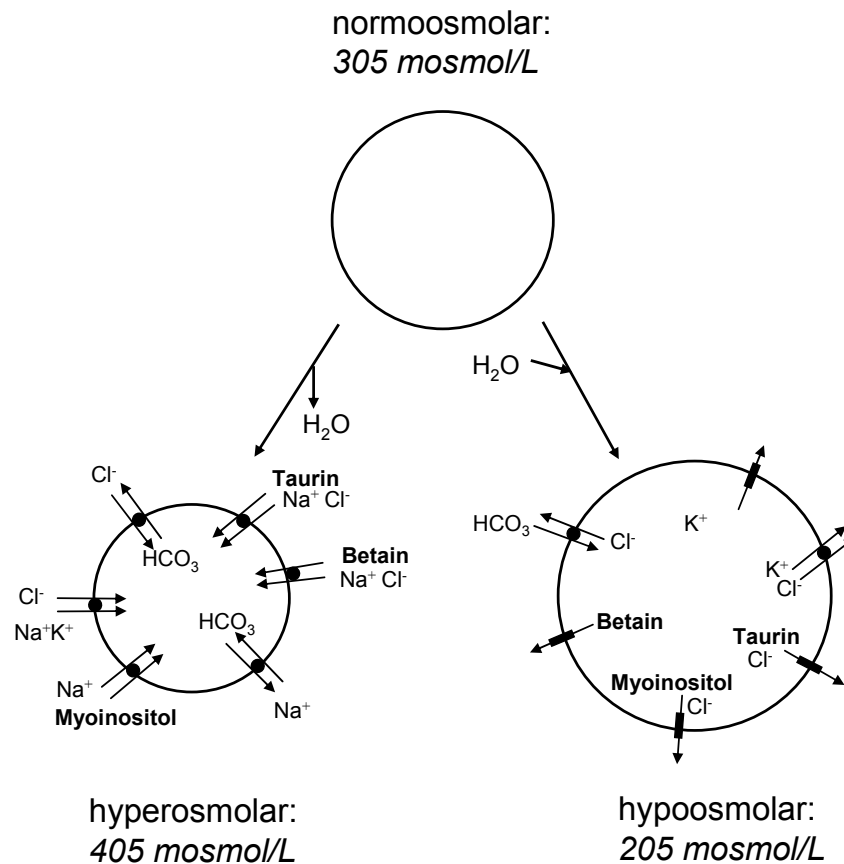


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der zellulären Regulation der Hydratationszustände (modifiziert nach Häussinger et al. [113])

Anisoosmolare Veränderungen sind von klinischer Relevanz, da bei Hyper- oder Hyponatriämie die Osmolaritäten im Plasma vom Normalzustand stark abweichen können (220-400 mosmol/L) [113, 129, 130]. Die zelluläre Hydratation und die dadurch beeinflusste Proliferation und Apoptose der Zelle spielt somit eine wichtige Rolle für die gesamte Physiologie des Organismus. Schon moderate hyperosmolare Bedingungen bei einer Hypernatriämie sind in der Lage eine Translokation von CD95 zur Zellmembran auszulösen und so eine Sensibilisierung der Leberzellen für apoptotische Stimuli zu bewirken [115].

Die hepatische Zellhydratation hat einen wichtigen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Leber gegenüber CD95-vermittelter Zytotoxizität. Unter normoosmotischen Bedingungen liegt der Todesrezeptor CD95 vorwiegend intrazellulär vor. Bei einer Osmolarität von 405 mosmol/L transloziert CD95 Liganden-unabhängig zur Plasmamembran, ähnlich den Vorgängen unter Gallensäuren-Stimulation. Jedoch kommt es hier nicht zur Apoptose-Induktion, sondern lediglich zu einer Sensitivierung der Hepatozyten gegenüber dem CD95-Ligand-abhängigen Apoptoseweg.

Hyperosmotische Bedingungen induzieren eine rasche endosomale Ansäuerung, welches die saure Sphingomyelinase aktiviert und zu einer konsekutiven Ceramid-Bildung führt. Die Ceramide aktivieren nun die PKC ζ , die wiederum eine NADPH-Oxidase-Aktivierung und Generierung von ROS induziert [131]. Oxidativer Stress aktiviert die Yes-Kinase, die mit dem EGF-R assoziiert, der wiederum von der Yes-Kinase phosphoryliert und somit aktiviert wird. Die beiden Proteine dissoziieren wieder. Die JNK, ebenfalls durch die Yes-Kinase aktiviert, bewirkt eine Assoziation des EGF-R mit CD95. Folgend phosphoryliert der EGF-R CD95 an Tyr²³² und Tyr²⁹¹, woraufhin es zur Translokation des Rezeptors zur Membran kommt. Letztendlich wird die DISC-Formation induziert (FADD/Caspase8/CD95) [101]. Aufgrund der transienten JNK-Aktivierung und der Aktivierung eines anti-apoptotisch wirkenden Erk-Signals ist die Translokation des CD95 teilweise reversibel. Trotz der Fähigkeit der Caspase-Aktivierung ist das hyperosmotisch-induzierte Signal alleinig nicht potent genug eine Apoptose zu induzieren [115].

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 2.1: Überblick über die verwendeten Geräte

GERÄT	FIRMA
3111 Forma Scientific CO ₂ Water-jacketed Incubator, Inkubator	Thermo Scientific, Langenselbold (D)
7500 Real-Time-PCR System	Applied Biosystems, Weiterstadt (D)
BP1200, Feinwaage	Sartorius, Göttingen (D)
Centrifuge 5415 R, Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg (D)
Cryofuge 6000, Zentrifuge	Heraeus Sepatech, Osterode (D)
CURIX 60, Filmentwickler	AGFA, Köln (D)
Electrophoresis Power Supply-EPS 600, Spannungsquelle	Pharmacia Biotech, Karlsruhe (D)
GeneQuant II, Photometer	Pharmacia, Karlsruhe (D)
Inolab ph Level 1, ph-Meter	WTW, Weilheim (D)
LSM 510, Laserscanning-Mikroskop	Zeiss, Jena (D)
Osmomat 030, Gefrierpunktsmometer	Gonotec, Berlin (D)
Sonorex RK 103 H, Ultraschallbad	Bandelin Electronics, Berlin (D)
semi dry transfer Horizontalapparat, Multiphor II, Blottingapparatur	Pharmacia, Freiburg (D)
Thermomixer compact, Thermomixer	Eppendorf, Hamburg (D)
Ultrospec 2100 pro, UV/visible Spectrophotometer, Photometer	Amersham Biosciences, Freiburg (D)
UniVapo 150 H, Vakuumkonzentrator	UniEquip, München (D)
Z37, 507-1, Elektrophoresekammer	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
ID 03, Mikroskop	Zeiss, Jena (D)

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle nicht aufgeführten Substanzen, die eingesetzt wurden, entsprachen der höchst zu erwerbenden Reinheit und wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, D) oder Merck (Darmstadt, D) bezogen.

- Acrylamid 4K-Lösung (30%) Mix 29:1: Applichem, Darmstadt (D)
- Agarose: Biozym, Oldendorf (D)
- Ampicillin: Fluka, Neu-Ulm (D)
- *Bio Rad Protein Assay*: BIO RAD, München (D)
- Bromphenol Blau: Biorad, München (D)
- BSA (Rinderserumalbumin), Fraktion V: Roth, Karlsruhe (D)

- *Complete Protease-Inhibitor-Cocktail* (Tabletten): Roche, Mannheim (D)
- *ECL Western Blotting* Detektionssystem: Perkin Elmer Lifesciences, Boston (USA)
- Ethidiumbromid: Roth, Karlsruhe (D)
- Filterpapier: Whatman, Maidstone (GB)
- Hyperfilm: Amersham, Freiburg (D)
- Kanamycin: Fluka, Neu-Ulm (D)
- *Low Range DNA Ladder*: Fermentas, St Leon-Roth (D)
- *Non-Fat Dry Milk*: Bio-Rad, München (D)
- Novex[®] *Sharp Pre-Stained Protein Standards*: Invitrogen, Karlsruhe (D)
- PageRulerTM *Plus Prestained Protein Ladder*: Fermentas, St. Leon-Roth (D)
- Penicillin: Fluka, Neu-Ulm (D)
- Ponceau S: Serva, Heidelberg (D)
- Protran[®] Nitrozellulose Membran: Schleicher & Schuell, Bioscience, Dassel (D)

2.1.3 Reagenzien und Inhibitoren für die Zellkultur

Aktinomyzin D	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Apocynin	Calbiochem, Darmstadt (D)
Bafilomycin A	Alexis Biochemicals, San Diego (USA)
Betain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Calyculin A	Biomol, Hamburg (D)
Caspase 3	BD Biosciences/ BD Pharmingen, San Diego (USA)
Cholinchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
CD95L	Alexis Biochemicals, San Diego (USA)
Epigallocatechin Gallat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Erythropoetin (Epo)	Roche, Mannheim (D)
GCDC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Genestein	Calbiochem, Darmstadt (D)
Gö6976	Calbiochem, Darmstadt (D)
GW4064	Tocris biosciences, Bristol (UK)
IFN- α (Roferon [®] A)	Roche, Mannheim (D)
IL-6	Biosource, Camarillo (USA)
M-CSF	R&D Systems, Minneapolis (USA)

Methionin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
MG 132	Calbiochem, Darmstadt (D)
Myoinositol	Biomol, München (D)
N-Acetylcystein (NAC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Okadainsäure	Biomol, München (D)
PD098059	Calbiochem, Darmstadt (D)
SAM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
SB220025	Alexis Biochemicals, San Diego (USA)
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Taurin	MP Biomedicals, Eschwege (D)
TCDC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Trolox	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Z-IETD-FMK	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Z-DEVD-FMK	R&D Systems, Minneapolis (USA)

2.1.4 Lösungen und Puffer

<u>APS</u>	10 % (w/v)	
<u>Blockierungs-Lösung</u>	1 - 5 % (w/v) BSA oder Milchpulver in TBST	
<u>Blotting-Puffer</u>	40 mM	SDS
	10 mM	Glyzin
	10 mM	Tris
	25 %	Methanol
<u>Elektrophorese-Puffer</u>	25 mM	Tris
	4 mM	SDS
	250 mM	Glycin
<u>Krebs-Henseleit-Puffer</u>	1,18 mM	MgCl ₂
	1,23 mM	NaH ₂ PO ₄
	5,9 mM	KCl
	115 mM	NaCl
	1,25 mM	CaCl ₂
	25 mM	NaHCO ₃
	1,2 mM	Na ₂ SO ₄

<u>RL-Lysis-Puffer</u>	20 mM	Tris pH 7,4
	140 mM	NaCl
	10 mM	NaF
	10 mM	Natriumpyrophosphat $\times 10 \text{ H}_2\text{O}$
	1 %	Triton X-100
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	1 mM	Natriumorthovanadat
	20 mM	β -Glycerophosphat
<u>2 $\times$ SDS Auftrags-Puffer</u>	220 mM	Tris/HCl pH 6,8
	9 %	SDS
	40 %	Glyzerin
	0,125 %	Bromphenolblau
	1 M	DTT
<u>TBS-T</u>	20 mM	Tris pH 7,4
	150 mM	NaCl
	0,1 %	Tween 20

2.1.5 Kits

Tab. 2.2: Überblick über die verwendeten Kits

KIT	FIRMA, ORT
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAshredder	Qiagen, Hilden (D)
QuantiTect Reverse Transcriptions Kit	Qiagen, Hilden (D)
Rneasy Kit	Qiagen, Hilden (D)
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt (D)

2.1.6 Antikörper

Tab. 2.3: Übersicht der verwendeten Antikörper für Western Blot und Immunzytochemie

ANTIKÖRPER	FIRMA, ORT
Cy-3 konj. goat anti-rabbit	Dianova, Hamburg (D)
ECL Anti-rabbit IgG	Amersham, Freiburg (D)
ECL Anti-mouse IgG	Amersham, Freiburg (D)
Fibrinogen	Upstate, Lake Placid (USA)
FITC konj. rabbit anti-mouse	Dako, Hamburg (D)
GAPDH	Biodesign international, Saco (USA)

Gp130	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz (USA)
Gp80	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz (USA)
HA-tag	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz (USA)
IFNAR1	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz (USA)
IFNAR2	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz (USA)
MxA	Prof. Dr. Otto Haller, Virologie, Universitätsklinikum Freiburg (D)
P17 Caspase 3	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz (USA)
PARP	BD Pharmingen, San Diego (USA)
PKR	Cell signaling Technology, Denver (MA,USA)
P-STAT1 (Tyr ⁷⁰¹)	Cell signaling Technology, Denver (MA,USA)
P-STAT2 (Tyr ⁶⁹⁰)	Cell signaling Technology, Denver (MA,USA)
P-STAT3 (Tyr ⁷⁰⁵)	Cell signaling Technology, Denver (MA,USA)
P-SHP2 (Tyr ⁵⁸⁰)	New England Biolabs, Beverly (USA)
SHP2	New England Biolabs, Beverly (USA)
STAT1	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz (USA)
STAT3	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz (USA)

2.1.7 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG/ Operon, Ebersberg (D) synthetisiert.

Tab. 2.4: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide für die RT-PCR

BEZEICHNUNG	SENSE PRIMER	ANTISENSE PRIMER
human-HPRT1	5'-gcttccttggtcaggcagt-3'	5'-gcttgcgaccttgacctct-3'
rat HPRT1	5'-tgctcgagatgtcatgaagga-3'	5'-cagagggccacaatgtgatg-3'
rat-gp130	5'-ccgtcagtgcgaagtgttctca-3'	5'-cactatccaccagctgcaggt-3'
human-MxA	5'-tttcagcacctgatggcctat-3'	5'-tggatgatcaaagggatgtgg-3'

Tab. 2.5: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide für die Mutagenese von Epo/gp130

BEZEICHNUNG	SENSE PRIMER	ANTISENSE PRIMER
EpoR/gp130 800-806 DHVEGGD I	5'-acacgagctccactgtccagtattc-3'	5'-ccatcaccgccttcgacatggtctactaat-3'
EpoR/gp130 800-806 DHVEGGD II	5'-gaccatgtcgaaggcggtgatgtattt tgc-3'	5'-cggtggatcccgtgagcatgtagccgcctt-3'
EpoR/gp130 AA 800-806 DHVEGGE I	5'-acacgagctccactgtccagtattc-3'	5'-aaataccttcaccgccttcgacatggtctactaat-3'
EpoR/gp130 AA 800-806 DHVEGGE II	5'-tgtcgaaggcggtgaagggttttgcacag caac-3'	5'-cggtggatcccgtgagcatgtagccgcctt-3'
EpoR/gp130	5'-cggtggatcccgtgagcatgtagccgc ctt-3'	5'-acacgagctccactgtccagtattc-3'

2.1.8 Plasmide

Tab. 2.6: Überblick über die verwendeten Plasmide

BEZEICHNUNG	BEZUG	BESCHREIBUNG
pGEM [®] -Teasy Vektor System	Promega, Mannheim (D)	Konventionelles Vektorsystem zur Subklonierung von PCR-Fragmenten
pMT2T-IFNAR2-Ha	PD Dr. John J. Krolewski, Fachbereich für Pathologie und Labor-Medizin, Universität Kalifornien (USA)	Kodiert für komplettes Protein IFNAR2 und ist carboxyterminal an Hämagglutinin (HA)-tag fusioniert
pRc/CMV-EG	Prof. Dr. Fred Schaper, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, RWTH-Aachen (D)	Kodiert für den chimären Rezeptor Epo/gp130 (extrazelluläre Domäne Epo-Rezeptor und transmembran- und cytoplasmatische Domäne des Rezeptors gp130)

2.1.9 Zelllinien

Neben den folgend aufgeführten Zelllinien wurden primäre Rattenhepatozyten sowie humane periphere mononukleäre Zellen und Makrophagen verwendet (vgl. 2.2.2).

Tab. 2.7: Verwendete Zelllinien

ZELLINIE	ZELLTYP
HepG2	Ratten Hepatomzellen
NTCP-HepG2	Mit NTCP-GFP stabil transfezierte HepG2 Zellen
NIH-3T3	Maus Fibroblastenzellen

2.1.10 Medien und Zusätze für die Zellkultur

- DMEM F12 (1:1) GlutaMAX Medium: Invitrogen, Karlsruhe (D)
- DMEM GlutaMAX + 4,5 g/L D-Glucose + Pyruvat, Invitrogen, Karlsruhe (D)
- Dulbeccos-PBS: Invitrogen, Karlsruhe (D)
- Ficoll-Paque PLUS: Amersham Biosciences, Freiburg (D)
- Fötale Kälberserum: Biomol, Hamburg (D)
- Geneticin: Gibco, Paisley (GB)
- Hanks Salzlösung (HBSS): Biochrom, Berlin (D)
- Insulin: Sigma-Aldrich, München (D)

- Kollagen: Sigma-Aldrich, München (D)
- L-Glutamin: Gibco Life Technologies, Karlsruhe (D)
- Lipofectamine 2000: Invitrogen, Karlsruhe (D)
- OptiMEM: Invitrogen, Karlsruhe (D)
- Penicillin - Streptomycin: Gibco Life Technologies, Karlsruhe (D)
- RPMI 1640 Medium: Gibco Life Technology, Karlsruhe (D)
- Trypsin/ EDTA: Invitrogen: Karlsruhe (D)
- William's E Medium: Gibco Life Technology, Karlsruhe (D)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Transformation von Bakterien

Zunächst wurden 100 µl chemisch kompetenter *Escherichia (E.) coli* Bakterien (JM109) auf Eis aufgetaut und mit ca. 5 ng Plasmid-DNA versetzt. Der Transformationsansatz wurde für 2 min auf Eis und anschließend für 45 sec im 42°C-Wasserbad inkubiert. Dieser Hitzeschock permeabilisierte kurzzeitig die Zellmembran und führte so zur Aufnahme der DNA in das Bakterium. Nach einer 2-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden 900 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und diese 1 h im Schüttler (170 rpm) bei 37°C inkubiert. Es wurden jeweils 10 µl und 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Selektivagarplatten (100 µg Ampicillin/ Penicillin/ Kanamycin/ ml Medium) ausgestrichen und mindestens für 14 h bei 37°C inkubiert.

<u>SOC-Medium:</u>	2 % (w/v)	Bacto-Trypton	
	0,5 % (w/v)	Bacto-Hefeextrakt	
	10 mM	NaCl	
	2,5 mM	KCl	
	10 mM	MgCl ₂	
	10 mM	MgSO ₄	
	20 mM	Glucose	→ pH 7

2.2.1.2 Kultivierung von Bakterien

Die auf LB-Selektiv-Agarplatten ausplattierten *E. coli* JM109-Zellen wurden mindestens 14 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für die Stammanzucht von *E. coli* wurden Einzelkolonien von Agarplatten verwendet und in Flüssigkulturen überführt. Die Kultivierung erfolgte in LB-

Medium für ca. 14 h bei 37°C im Schüttler (170 rpm). Zur Selektionierung auf plasmidvermittelte Resistenzen wurden den Medien entsprechende Antibiotika zugesetzt: Ampicillin, Penicillin oder Kanamycin (0,01 % (w/v)).

LB-Medium (1 l): 10 g Bacto-Trypton
 10 g NaCl
 5 g Bacto-Hefeextrakt → pH 7

LB-Selektivagarplatten: 2 % LB-Medium und 2 % Select Agar wurden in dH₂O gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C wurde das Antibiotikum (0,01 % (w/v)) hinzugegeben und die Lösung in Platten gegossen. Für eine Blau-Weiss-Selektion der pGEM[®]-*Teasy*-Konstrukte wurde der Lösung zusätzlich IPTG und X-Gal (5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside) hinzugesetzt [100 µg/ ml].

2.2.1.3 Isolierung von Plasmid DNA aus E. coli

Die auf der Grundlage der alkalischen Lyse basierenden Minipräparationen wurden mit Hilfe des Mini-Plasmidreinigungskits der Firma Qiagen durchgeführt. Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das Qiagen Maxi-Plasmidreinigungskit eingesetzt.

2.2.1.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der DNA (oder RNA) erfolgte anhand photometrischer Messung durch Bestimmung der Extinktion der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt aufgrund der aromatischen Ringe der Basen bei einer Wellenlänge von 260 nm. Proteine hingegen zeigen im Absorptionsspektrum ein Maximum von 280 nm. Diese Tatsache basiert vornehmlich auf den aromatischen Aminosäuren Tryptophan (280 nm) und Tyrosin (276 nm). Der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und der Extinktion bei 280 nm gibt somit Aufschluss über den Reinheitsgrad der DNA. Dieser Quotient sollte optimalerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Das hier verwendete Gerät bestimmte die Konzentration der DNA direkt und bestimmte die Reinheit der DNA durch das oben beschriebene Verhältnis der Extinktionen bei den verschiedenen Wellenlängen.

2.2.1.5 Restriktion von DNA

Die spezifische Spaltung von DNA zu analytischen oder präparativen Zwecken (Überprüfung des Klonierungserfolges bzw. Erzeugung kompatibler Enden für die Ligation) erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen. Diese schneiden spezifisch palindromische DNA-Sequenzen. Je nach Restriktionsstelle können glatte (*blunt ends*) oder überhängende (*sticky ends*) Enden generiert werden. Die Pufferbedingungen, Inkubationstemperaturen und Inkubationszeiten wurden den Angaben der Hersteller (New England Biolabs und Roche) entnommen. Die resultierenden Fragmente wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anhand der Größe identifiziert.

2.2.1.6 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Anhand der Agarose-Gelelektrophorese konnten DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. In Abhängigkeit von den erwarteten Fragmentgrößen wurden 0,5-1,2 % ige (w/v) Agarosegele verwendet. Dazu wurden entsprechende Agarosemengen durch Erhitzen in 50 ml 1x TAE-Puffer gelöst, nach Abkühlung auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid (0,75 µg/ ml) versetzt und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100-120 Volt. Die DNA-Fragmente wurden durch das interkalierte Ethidiumbromid bei UV-Licht (312 nm) nachgewiesen. Gegebenenfalls wurde die gewünschte DNA-Fragmentbande fotografiert oder für präparative Zwecke aus dem Gel isoliert.

<u>TAE-Puffer (50x):</u>	2 M	Tris/ HCl	
	1 M	Essigsäure	
	0,05 M	EDTA	→ pH 7,5 - 7,8

2.2.1.7 Isolierung von DNA aus Agarose

Nach Identifizierung der gewünschten DNA-Bande wurde diese mit einem Skalpell herausgetrennt und nachfolgend mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraktion kit* (Qiagen, Hilden (D)) nach Anleitung isoliert.

2.2.1.8 Ligation von DNA

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die Ligase des Phagen T4 verwendet, welche die Verknüpfung kohäsiver Enden der Ligationspartner vermittelt. Um möglichst äquimolare

DNA-Mengen für die Ligation einzusetzen, wurde das Verhältnis von Vektor zu Insert zugunsten des Inserts verschoben (ca. 1:3). Pro Ansatz wurden 0,1-0,2 µg Vektor- und 0,3 – 0,6 µg Insert-DNA eingesetzt. Die Ligation erfolgte in einem Endvolumen von 15 µl über Nacht bei 4°C. Dabei wurden 2 µl T4-DNA-Ligase (3 U/ µl) und 1,5 µl Ligations-Puffer (10 x) verwendet. Als Negativkontrolle diente ein identischer Ansatz ohne Insert.

2.2.1.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die *polymerase chain reaction* (PCR) ist eine Methode, um DNA-Bereiche selektiv zu amplifizieren. Dabei werden an eine einzelsträngige DNA zwei zur Matrize komplementäre Primer spezifisch angelagert, die die zu amplifizierende DNA-Region flankieren. Die DNA-Polymerase kann nun zu den angrenzenden Bereichen den komplementären Strang bilden. Dazu wurde die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet. Die PCR wird konkret in drei Schritte gegliedert:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge (ca. 95°C).
2. Annealing der Primer (bei ca. 45-65°C, in Abhängigkeit der Primer-Eigenschaften)
3. Synthese der komplementären Stränge (68-72°C)

Dieser Zyklus wurde pro durchgeführter PCR 24-30 mal wiederholt. Die optimale Annealing-Temperatur der Primer für die durchgeführten PCR-Reaktionen wurde anhand des DNA-Schmelzpunktes (T_M) der Primer gewählt (Sequenz der Primer: vgl. Tabellen unter 2.1.8). Die optimale Annealing-Temperatur der Primer lag dabei knapp unterhalb von T_M . Um unspezifische Amplifikationen zu vermeiden, wurde eine „Hot-start“-PCR durchgeführt. Die für die Amplifikation notwendige Taq-Polymerase wurde erst nach der ersten Denaturierungsphase (den ersten fünf Minuten Denaturierungstemperatur (95°C)) dem Reaktionsgefäß hinzugefügt.

PCR-Ansatz:

<i>forward</i> Primer (5 pmol/µl)	5 µl
<i>reverse</i> Primer (5 pmol/µl)	5 µl
Template (0,1 µg/µl)	3 µl
Puffer (10x)	5 µl
dNTP (2,5 mM)	5 µl
<u>Taq-Polymerase</u>	<u>1 µl</u>

add. 50 µl mit dH₂O

PCR-Programm:

95 °C	4 min	
95 °C	1 min	
58 - 65 °C	30 sek	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	30 x
4 °C	∞	

Zur Detektion der synthetisierten PCR-Produkte diente eine Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.1.10 Amplifizierung und Mutagenese des chimären Rezeptors Epo-gp130

Der Expressions-Vektor pRc/CMV-EG, kodierend für den chimären Epo/gp130 Rezeptor (pRc/CMV-EG (YYYYYYY)), ist in der Literatur beschrieben [132] und wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Schaper (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, RWTH-Aachen, Deutschland) bereitgestellt. Er kodiert für die extrazelluläre Domäne des Epo-Rezeptors und für die transmembran- und zytoplasmatische Domäne des Rezeptors gp130. Die Mutationen im potentiellen Spalt-Motiv für die Caspase 3 im chimären Epo/gp130 Rezeptor wurden durch eine Mutagenese-PCR mit den in Tab. 2.6 aufgeführten Oligonukleotiden eingefügt (vgl. Abb. 2.1): Für EpoR/gp130 AA 800-806 DHV**E**GGD wurden die Primer EpoR/gp130 800-806 DHV**E**GGD I und EpoR/gp130 800-806 DHV**E**GGD II und für EpoR/gp130 AA 800-806 DHV**E**GG**E** wurden die Primer EpoR/gp130 AA 800-806 DHV**E**GG**E** I und EpoR/gp130 AA 800-806 DHV**E**GG**E** II verwendet. Die hieraus entstandenen PCR-Produkte wurden als Templates genutzt und mit den Primern EpoR/gp130 durch eine neue PCR-Reaktion fusioniert. Die daraus resultierenden PCR-Produkte wurden in den Klonierungs-Vektor pGEM[®]-T Easy (Promega, Mannheim (D)) subkloniert und sequenziert. Letztendlich wurden die mutierten Fragmente in den Expressions-Vektor pRc/CMV-EG eingefügt. Dazu dienten die Schnittstellen BspEI und für eine *blund end* Ligation SpeI/ ApaI.

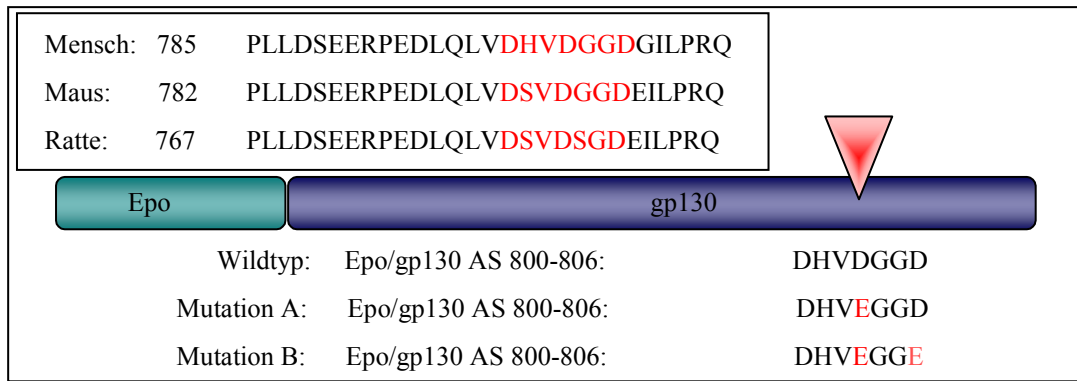


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der verschiedenen Epo/gp130 Konstrukte

Der Rezeptor gp130 besitzt in seiner Aminosäure-Sequenz ein für die Caspase 3 potientes Spalt-Motiv (DXXD). Die Aminosäure-Sequenz von gp130 des Menschen, der Maus und der Ratte belegen eine Konservierung dieses Motives. Um die potentielle Spaltstelle für die Caspase 3 gezielt zu verändern, wurde der chimäre Rezeptor Epo/gp130 in dem Spalt-Motiv DHVDGGD mutiert. Asparaginsäure (D) 803 bzw. 803 und 806 wurden durch Glutaminsäure (E) ersetzt.

2.2.1.11 Reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR

Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Kit[®] (Qiagen, Hilden (D)) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA photometrisch (vgl. 2.2.1.4). Für die Standardisierung der relativen mRNA-Spiegel wurde die endogene Kontrolle Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) verwendet. Sämtliche verwendete Oligonukleotide sind der Tabelle 2.5 unter 2.1.6. zu entnehmen. Die mRNA wurde zuerst in einem separaten Schritt in cDNA umgeschrieben. Für diese reverse Transkription wurde das *QuantiTect Reverse Transcriptions Kit* nach Angaben des Herstellers verwendet. Anschließend wurde die cDNA mittels *SYBR[®] Green PCR Master Mix* mit dem *ABI 7500 Real Time PCR System* in 96-Well-Reaktionsplatten mit haftender Abdeckung bestimmt. Die PCR-Zyklen wurden wie folgt gewählt: 2 min 50°C, 10 min 95°C, danach 40 Zyklen mit 15 sek. bei 95°C und 1 min bei 60°C. Die amplifizierte DNA wurde im Anschluss an die PCR mit der Erstellung einer Schmelzkurve überprüft. Semiquantitative PCR-Ergebnisse wurden über die $\Delta\Delta CT$ -Methode erworben [133-135]. Schwellenwerte wurden zu HPRT1 normalisiert und in Bezug zu unstimulierten Kontrollzellen gesetzt.

2.2.1.12 Sequenzierung

Die Sequenzierungen der Konstrukte erfolgte durch die Firma MWG/Operon, Ebersberg (D).

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung primärer Rattenhepatozyten

Primäre Hepatozyten wurden durch Kollagenaseperfusion von männlichen Wistar-Ratten isoliert [136-137]. Es wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen auf mit Kollagen beschichteten Kulturschalen (36 mm Durchmesser) ausplattiert und für zwei Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ in Krebs-Henseleit-Puffer mit 6 mmol/L Glucose kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und in Williams Medium E (versetzt mit 2 mmol/l Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 10^{-7} mol/l Insulin, 10^{-7} mol/l Dexamethason und 5 % FCS) für weitere 24 h inkubiert. Vor Beginn des Experimentes wurden die Zellen erneut gewaschen und mit Williams E Medium (supplementiert mit Glutamin (2 mmol/l), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (0,1 mg/ml) und FCS (5 %)) für 2 h kultiviert. Die Viabilität der Hepatozyten wurde durch Trypanblau-Färbung bestimmt und betrug mehr als 95 %.

2.2.2.2 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen

Periphere mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells* = PBMC) wurden aus dem Blut humaner, männlicher Spender präpariert. Die *Buffy Coats* wurden vom Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf bezogen und sind ein Lymphozytenkonzentrat, welches man nach dem Abzentrifugieren von Vollblut erhält. Aus diesem Lymphozytenkonzentrat lassen sich mittels Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ficoll-Hypaque die mononukleären Zellen des peripheren Blutes isolieren [138]. Dabei sammeln sich die Lymphozyten und Monozyten, entsprechend ihrer spezifischen Dichte, in der Interphase zwischen dem Überstand und dem Ficoll-Hypaque an. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Hanks Salzlösung (HBSS) gewaschen und in RPMI 1640 Medium supplementiert mit 10 % FCS und Penicillin/ Streptomycin (100 U/ml) ausplattiert. Für die Ausdifferenzierung von Makrophagen wurden die PBMC 7 Tage mit dem Wachstumsfaktor M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) stimuliert (10 ng/ ml).

2.2.2.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die HepG2 Zellen wurden in „Dulbecco's modified Eagle Medium“ (DMEM) F12 mit Glutamax plus 10% fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Für die *Na⁺/taurocholate cotransporting protein-enhanced green fluorescent protein* (NTCP-GFP) transfezierten

HepG2 Zellen wurde das Medium zusätzlich mit 400 mg/l Geneticin supplementiert. Dahingegen wurden die NIH-3T3 Zellen mit DMEM GlutaMAX Medium versetzt mit 4,5 g/L D-Glucose und Pyruvat mit einem Gehalt von 10% an FCS kultiviert. Die Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. Die Passage der Zellen fand alle drei bis vier Tage mit einer Verdünnung von 1:10 – 1:20 statt.

Die Gallensäuren wurden in Medium gelöst. Wasserlösliche Inhibitoren und Betain wurden ebenfalls in Medium gelöst. Nichtwasserlösliche Substanzen wurden in DMSO aufgenommen. DMSO hatte dabei in den verwendeten Konzentrationen keinen Eigeneffekt auf die untersuchten Parameter.

Um hyperosmolares Medium (405 mosmol/L) herzustellen, wurde dem Medium 50 mM NaCl durch eine definierte Menge einer 5 M Stocklösung zugegeben. Hypoosmolares Medium (205 mosmol/l) wurde durch eine 2:3 Mischung des DMEM F12 Mediums (900 mg/L Glukose) w/o NaCl mit DMEM F12 (900 mg/L Glukose) hergestellt. Die eingestellten Osmolatitäten wurden am Osmometer überprüft.

2.2.2.4 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Für eine hohe Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit Lipofectamine 2000 transfeziert. In einem Ansatz wurden 20 µl Lipofectamine 2000 in 1000 µl OptiMEM verdünnt. Gleichzeitig wurden 8 µg DNA in 200 µl OptiMEM aufgenommen. Anschließend wurde die verdünnte DNA mit dem Lipofectamin-Gemisch vermengt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde eine konfluente Flasche (75 cm²) mit Zellen trypsinisiert und letztendlich in 4 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Nach der 20 minütigen Inkubationszeit wurden 1,2 ml der resuspendierten Zellen zu dem Transfektionsansatz gegeben, 4,3 ml Zellkulturmedium hinzugegeben und die Zellen auf vier 60-mm Kultur-Schalen ausgesät. Nach 4 h und nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Experimente wurden nach 48 h Expressionszeit wie angegeben gestartet.

2.2.3 Proteinanalytische Methoden

2.2.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Nach Ablauf der Versuchszeiten wurde das Medium von den Zellen entfernt, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in RL-Puffer lysiert und bei 14.000 x g und 4°C für 5 Minuten

zentrifugiert. Die Überstände enthielten nun das geklärte Lysat und wurden bei -20°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde nach Bradford mit Hilfe des BioRad-Protein-Assays durchgeführt [139]. Demnach bindet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 an basische Aminosäurereste von Proteinen und verschiebt dadurch sein Absorptionsmaximum von 465 nm (rot) auf 595 nm (blau). Die Bindung des Farbstoffes an das Protein erfolgt innerhalb von 2 min. Dabei bleibt der Protein-Farbstoffkomplex ca. 1 h löslich, währenddessen die Extinktion bei $\lambda=595$ nm am Photometer gemessen wurde. Für die Messung wurden 5 μl Lysat (bzw. 5 μl verdünntes Lysat), 795 μl dH_2O und 200 μl Bradfordreagenz (Bio Rad ProteinAssay) in einer Einwegküvette gemischt. Durch die Darstellung einer Eichgerade wurden die Extinktionen von BSA (Bovines Serumalbumin)-Lösungen gegen deren bekannte Konzentrationen aufgetragen. Anhand der gemessenen Extinktion der Probe konnte nun die Proteinkonzentration bestimmt werden.

2.2.3.2 SDS-Page

Wenn nicht anders erwähnt, wurden 60 μg Gesamtprotein des Zelllysates mit der gleichen Volumenmenge an 2 x SDS Ladungspuffer versehen und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Proteine wurden in einer vertikalen, diskontinuierlichen SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese) elektrophoretisch aufgetrennt [140]. Die Prozentigkeit der PAA-Gele variierte je nach Größe der aufzutrennenden Proteine. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für einen Western-Blot verwendet (vgl. 2.2.2.3).

Polyacrylamid-Sammelgel (5%)	13,6 ml	dH_2O
	3,4 ml	30% Acrylamid/ Bisacrylamid 29:1
	2,5 ml	1 M Tris/HCl pH 6,8
	200 μl	10% SDS
	200 μl	10% APS
	20 μl	TEMED
Polyacrylamid-Trenngel (10 %)	11,9 ml	dH_2O
	10 ml	30% Acrylamid/ Bisacrylamid 29:1
	7,5 ml	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
	300 μl	10% SDS
	300 μl	10% APS
	12 μl	TEMED

2.2.3.3 Western-Blot Analyse

Western-Blot ist der Transfer von zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Membran. Auf dieser können die Proteine spezifisch über Antikörper nachgewiesen werden. Der Transfer der Proteine erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch die *semi-dry*-Methode [141] auf eine Nitrozellulosemembran (Protran Nitrozellulose Transfer Membrane, Schleicher und Schuell, Dassel). Es wurden je vier mit 1 x Blotting-Puffer getränkte Filterpapiere (Whatman Ltd., Maidstone, England) auf die Anoden-Platte gelegt, darüber die ebenfalls mit Blotting-Puffer befeuchtete Membran, gefolgt von dem Gel und vier weiteren Filterpapieren. Der Stromkreis wurde durch die Kathoden-Platte geschlossen und eine Stromstärke von 1 mA pro cm² angelegt. Nach 1 bis 2 h wurde der Proteintransfer beendet und die Membran 1 h in Blockpuffer inkubiert, um überschüssige Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen.

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen wurden Antikörper verwendet, die gegen Epitope der entsprechenden Proteine gerichtet waren. Dazu wurde die Membran mit den Erst-Antikörpern (in Blockpuffer) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei 10-minütigen Waschschritten folgte eine Inkubation mit den Zweit-Antikörpern (in Blockpuffer) für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran 3 mal 10 min mit TBST-Puffer bei RT gewaschen. Die Detektion des Zweit-Antikörpers, der mit einer Peroxidase konjugiert war, erfolgte über Chemilumineszenz. Hierzu wurde die Membran 1 min mit einer 1:1 Mischung des ECL-Reagenzes (Perkin Elmer, Boston, USA) inkubiert. Die Exposition erfolgte auf einem ECL-Hyperfilm (Amersham, Freiburg).

2.2.4 Immunzytochemie

Für immunzytochemische Färbungen wurden HepG2 Zellen auf Glas-Cover Slips (Ø 12 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) mit einer Dichte von $0,025 \times 10^6$ Zellen/ Cover Slip ausgesät. Zu Beginn der Färbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd 10 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1% Triton X-100 in PBS für 2 min permeabilisiert. Nach erneutem Waschen wurden unspezifische Bindungen durch Blockierung mit 1% FCS (w/v) in PBS abgesättigt. Darauf folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (1: 250 in PBS) für 2 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen der Zellen wurden diese mit einem FITC- bzw. Cy-3-gekoppelten Sekundärantikörper (1:100 bzw. 1:500) für weitere 60 min inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen wieder gewaschen und in *Vectashield Mounting* (Vector Laboratories, Burlingame,

USA) eingedeckt. Die mikroskopischen Untersuchungen wurden mit dem Laserscanning-Mikroskop LSM 510 (Zeiss, Jena, D) und der Software LSM 5 Image der Firma Zeiss durchgeführt.

2.2.5 *In vitro* gp130-Caspase Assay

Die Spaltung des gp130 Rezeptors und der chimären Epo-gp130 Rezeptoren durch aktive Caspase-3 wurde in einem *in vitro* gp130-Caspase Assay gezeigt. Dazu wurden die entsprechenden Zellen mit dem Lysis-Puffer des *Caspase-8-Fluorometric Assay Kit* (R&D Systems, Minneapolis (USA)) lysiert. Pro 300 µg Gesamtlisat wurden in einem Gesamtvolumen von 300 µl 10 µg/ml aktive Caspase 3 eingesetzt. Der *in vitro* gp130-Caspase Assay wurde, wie im Vorfeld für den EGF (epidermal growth factor)-Rezeptor beschrieben, durchgeführt [142]. Die Reaktion wurde in einem Puffer bestehend aus 20 mmol/L HEPES (pH 7,4), 100 mmol/L KCL, 3mmol/L Dithiothreitol und 0,2 µmol/L CaCl₂ ausgeführt. Durch die Zugabe von aktiver Caspase 3 wurde die Reaktion gestartet und die Ansätze für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von SDS-Auftragspuffer und einer Inkubation für 5 min bei 95°C gestoppt.

2.2.6 Statistik

Die gezeigten Westernblots/ PCRs sind repräsentativ für mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. Tabellarisch oder in Balkendiagramm dargestellte Daten wurden als Mittelwert ± S.E.M. (Standardabweichung des Mittelwerts) ausgedrückt. Die Untersuchung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels des Student-*t*-Tests. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem Konfidenzintervall von 95% ($p < 0.05$) als gegeben angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Modulation der IL-6 Signaltransduktion durch pro-apoptotische Stimuli

Der erste Teil dieser Dissertation befasst sich mit dem Einfluss von hydrophoben Gallensäuren, hyperosmotischem Stress und CD95-Ligand auf die IL-6-abhängige Signaltransduktion. Im zweiten Teil wurde die Modulation des IFN- α Signalweges durch pro-apoptotische Stimuli untersucht (3.2).

3.1.1 Einfluss pro-apoptotischer Stimuli auf den IL-6 Signalweg

IL-6 induziert in der Zielzelle über die Anbindung an die Rezeptoruntereinheit gp80 und die signalweiterleitende Untereinheit gp130 die Phosphorylierung von STAT3 (Tyr⁷⁰⁵; vgl. Einleitung 1.2). Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass die hydrophobe Gallensäure Glycochenodeoxycholsäure (GCDC) die IL-6-induzierte Phosphorylierung von STAT3 (Tyr⁷⁰⁵) inhibiert. Gleichzeitig wird die Expression der Rezeptoruntereinheit gp130 herabreguliert, wobei die Expression von STAT3 und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) unverändert bleibt (Abb. 3.1) [1].

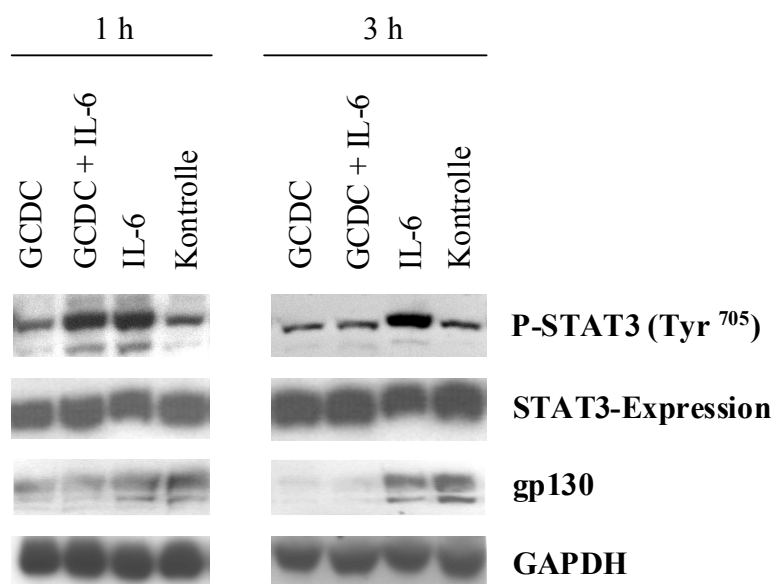


Abb. 3.1: Einfluss von GCDC auf die gp130-Expression und die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung
24 h kultivierte primäre Rattenhepatozyten wurden für 1 h bzw. 3 h ohne (Kontrolle) oder mit 100 μ M Glycochenodeoxycholsäure (GCDC) präinkubiert und die angegebenen Proben mit IL-6 (10 ng/ml) für weitere 20 min stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, 80 μ g Gesamt-Protein in einer 10 %igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Detektion der Proteine STAT3, gp130, sowie GAPDH erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Die Phosphorylierung von STAT3 wurde mit spezifischen Antikörpern gegen phosphoryliertes STAT3 (Tyr⁷⁰⁵) visualisiert. Modifiziert und entnommen aus Hepatology [1].

Wie in der Einleitung beschrieben, induzieren CD95L und hydrophobe Gallensäuren eine Apoptose und aktivieren die Caspasen-Kaskade. Milder hyperosmotischer Stress (405 mosmol/L) kann alleine keine Apoptose auslösen, aktiviert aber die Caspasen-Kaskade und sensibilisiert Hepatozyten gegenüber CD95-Ligand-vermittelter Apoptose [115]. Diese drei physiologisch vorkommenden pro-apoptotischen Faktoren/Bedingungen sind in der vorliegenden Arbeit als Stimuli gewählt worden, wobei hyperosmotischer Stress hauptsächlich für die Langzeit-Versuche verwendet wurde, da im Gegensatz zu CD95-Ligand oder GCDC unter diesen experimentellen Bedingungen keine signifikante Apoptose auftritt. Im folgenden Experiment wurde der Einfluss dieser pro-apoptotischen Stimuli auf die gp130-Expression analysiert. Die hydrophobe Gallensäure GCDC regulierte nicht nur in primären Rattenhepatozyten (A), sondern auch in NTCP-transfzierten HepG2 Zellen (B) die Expression von gp130 herab (vgl. Abb. 3.2). Andere Stimuli wie CD95-Ligand (C) und hyperosmotischer Stress (405 mosmol/L) (D) vermittelten ebenfalls eine rasche Abnahme der Rezeptorexpression in primären Rattenhepatozyten.

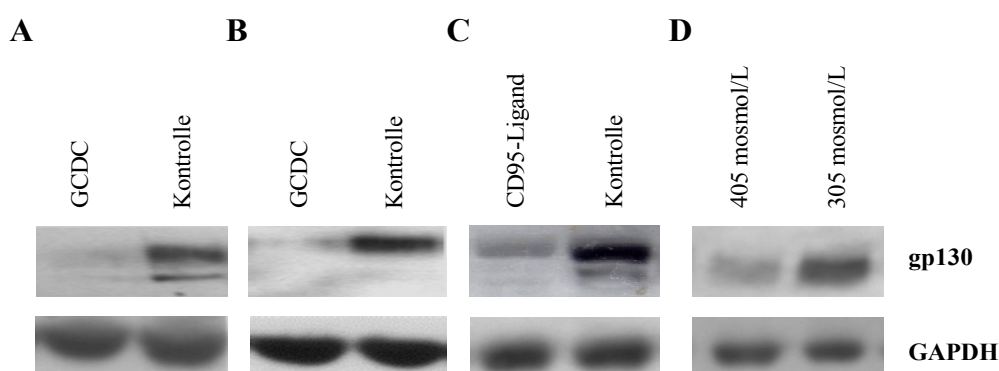


Abb. 3.2: Einfluss von pro-apoptotischen Stimuli auf die gp130-Expression in verschiedenen Leberzellen

24 h kultivierte primäre Rattenhepatozyten (A) oder NTCP-transfzierte HepG2 Zellen (B) wurden mit 100 μ M GCDC für 3 h inkubiert. 24 h kultivierte primäre Rattenhepatozyten wurden für 3 h mit 100 ng/ml CD95-Ligand (C) oder mit hyperosmotischem (405 mosmol/L) oder normoosmotischem (305 mosmol/L) Medium (D) inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und 80 μ g des Gesamt-Protein-Extraktes wurden im Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen gp130 und GAPDH.

Um die physiologische Relevanz pro-apoptotischer Stimuli auf die IL-6-induzierte Akut-Phase-Reaktion zu untersuchen, wurde die Expression von Fibrinogen- γ untersucht, welches STAT3-abhängig durch IL-6 induziert wird [143-145]. Für dieses Experiment wurde als Stimulus hyperosmotischer Stress gewählt, da nach 12 h Stimulation durch CD95-Ligand eine signifikante Apoptose in den Zellen ausgelöst wurde. Abb. 3.3 zeigt die nach 9 h IL-6-Stimulation induzierte Expression von Fibrinogen- γ in HepG2 Zellen. Eine Vorinkubation mit hyperosmotischem Medium (405 mosmol/L) für 3 h regulierte die Fibrinogen- γ -Expression herab (Abb. 3.3).

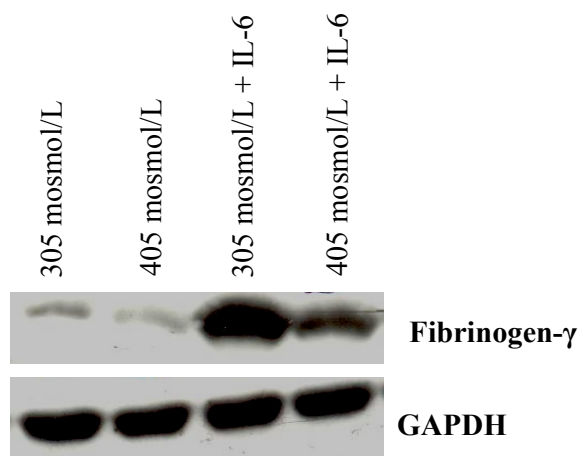


Abb. 3.3: Expression des IL-6-induzierten Proteins Fibrinogen-γ unter hyperosmotischen Bedingungen

HepG2 Zellen wurden über 3 h mit normosmotischem (305 mosmol/L) oder hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium vorinkubiert und anschließend 9 h mit 10 ng/ml IL-6 stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, das Gesamt-Protein-Extrakt generiert; anschließend erfolgte die Detektion der Proteine Fibrinogen-γ und GAPDH (als Beladungskontrolle) im Western Blot mittels spezifischer Antikörper.

IL-6 induziert neben der Phosphorylierung von STAT3 (Tyr⁷⁰⁵) auch die Phosphorylierung von SHP2 (Tyr⁵⁸⁰) und vermittelt so über verschiedene Adaptermoleküle die Aktivierung der ERK-Typ MAP-Kinasen durch die Phosphorylierung von ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) (vgl. Einleitung 1.3) [146]. Abb. 3.4 zeigt, dass die IL-6-vermittelte Phosphorylierung von SHP2 nach 3 h Vorinkubation mit dem CD95-Ligand in primären Rattenhepatozyten inhibiert wurde. Weiterhin wurde die IL-6-vermittelte ERK1/2 Aktivierung in An- und Abwesenheit des CD95-Liganden untersucht. Der CD95-Ligand induzierte wie IL-6 eine starke ERK1/2 Aktivierung, sodass bei der Kombination von Beiden keine synergistischen oder antagonistischen Effekte nachzuweisen waren.

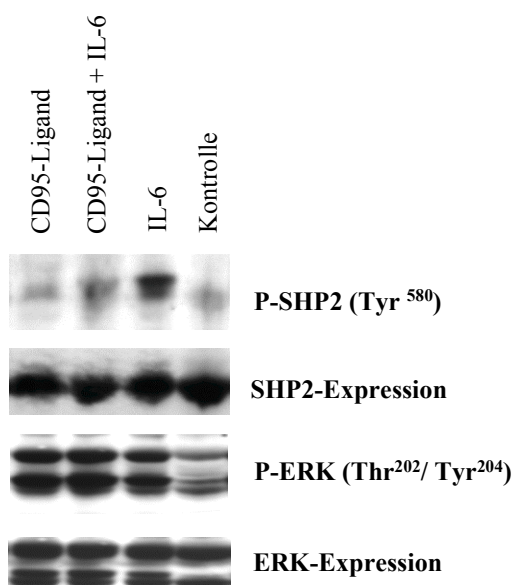


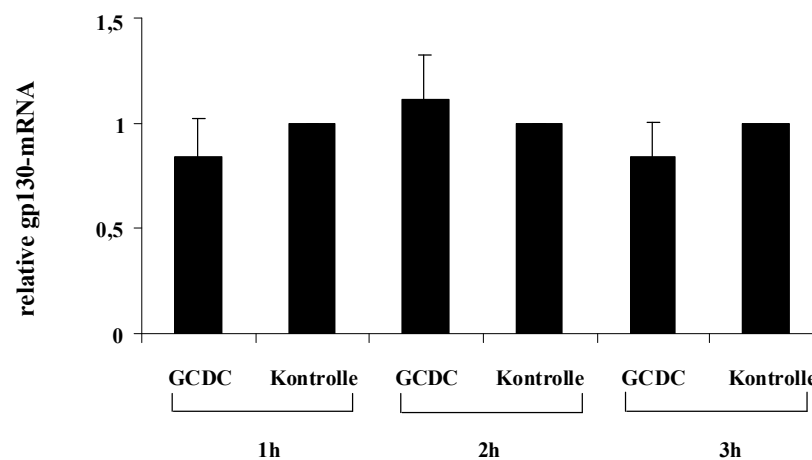
Abb. 3.4: Auswirkung des CD95-Liganden auf die IL-6-induzierte SHP2- und ERK-Phosphorylierung

Primäre Rattenhepatozyten wurden ohne (Kontrolle) oder mit dem CD95-Liganden (100 ng/ml) für 3 h präinkubiert, nachfolgend für weitere 20 min mit IL-6 (10 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und 80 µg des Gesamt-Protein-Extraktes im Western Blot aufgetragen. Die Detektion der Expression von SHP2 und ERK1/2 und der Phosphorylierung von SHP2 (Tyr⁵⁸⁰) und ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) erfolgte mittels spezifischer Antikörper.

3.1.2 Caspase-vermittelte Degradation von gp130

Um den ursächlichen Mechanismus für die reduzierte gp130-Proteinexpression unter proapoptotischen Bedingungen aufzudecken, wurde in den folgenden Experimenten die Expression der gp130-mRNA unter dem Einfluss von GCDC oder CD95-Ligand untersucht. Diese Substanzen zeigten keinen Einfluss auf die gp130-mRNA, sodass eine transkriptionelle Regulation für die beobachteten Effekte auf Proteinebene eher nicht in Frage kam (Abb. 3.5).

A



B

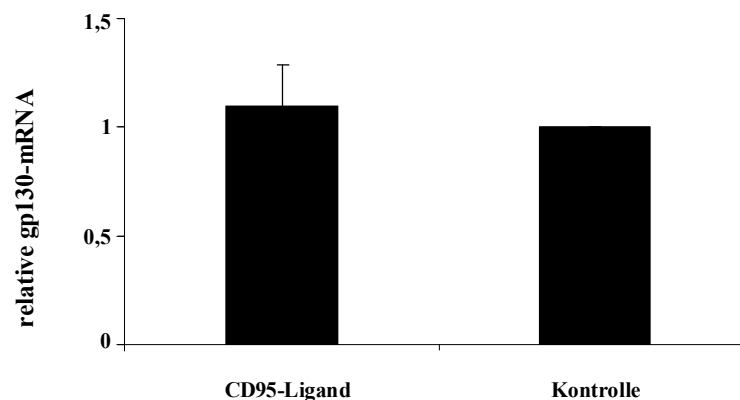


Abb. 3.5: Effekt von GCDC und CD95-Ligand auf die gp130 mRNA

(A) 24 h kultivierte primäre Rattenhepatozyten wurden für die angegebenen Zeitpunkte ohne (Kontrolle) oder mit 100 μ M GCDC inkubiert. (B) 24 h kultivierte primäre Rattenhepatozyten wurden 1 h mit CD95-Ligand (100 ng/ml) inkubiert oder unbehandelt gelassen (Kontrolle). Die Zellen wurden für eine RNA-Präparation lysiert und die relativen gp130 mRNA-Level in einer RT-PCR analysiert. Hierzu wurden spezifische Primer für gp130 und HPRT1 der Ratte (als endogene Kontrolle) verwendet. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta$ CT Methode berechnet [133-135]. Dargestellt sind die relativen mRNA-Level in Relation zur unstimulierten Kontrolle, die als 1 gesetzt wurde. Mittelwerte $\pm$ SEM; n = 3.

Im Folgenden wurden posttranskriptionelle Mechanismen untersucht, die die gp130 Herabregulation bewirken könnten. Dabei wurde die gp130-Proteinexpression in

Abhängigkeit des proteasomalen oder lysosomalen Proteinabbaus analysiert. Weder die Inhibition des Proteasoms durch den spezifischen Inhibitor MG132 noch die Blockade des Lysosoms durch Bafilomycin A konnten die CD95-Liganden- oder GDCD-induzierte Herabregulation von gp130 aufheben (Daten nicht gezeigt).

CD95-Ligand sowie pro-apoptotische Gallensäuren induzieren in Hepatozyten eine Apoptose und vermitteln eine Aktivierung der Caspase 3 und Caspase 8 (vgl. Einleitung unter 1.4.1 und 1.6.1). Die CD95-Liganden-vermittelte Apoptose wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Spaltung von PARP (poly ADP-ribose Polymerase) nachgewiesen, welches als 116 kDa Protein im Nukleus vorliegt. Eine Induktion der Apoptose vermittelte eine Spaltung dieses Proteins, wobei das Spaltprodukt bei 85 kDa detektiert wurde (vgl. Abb. 3.6).

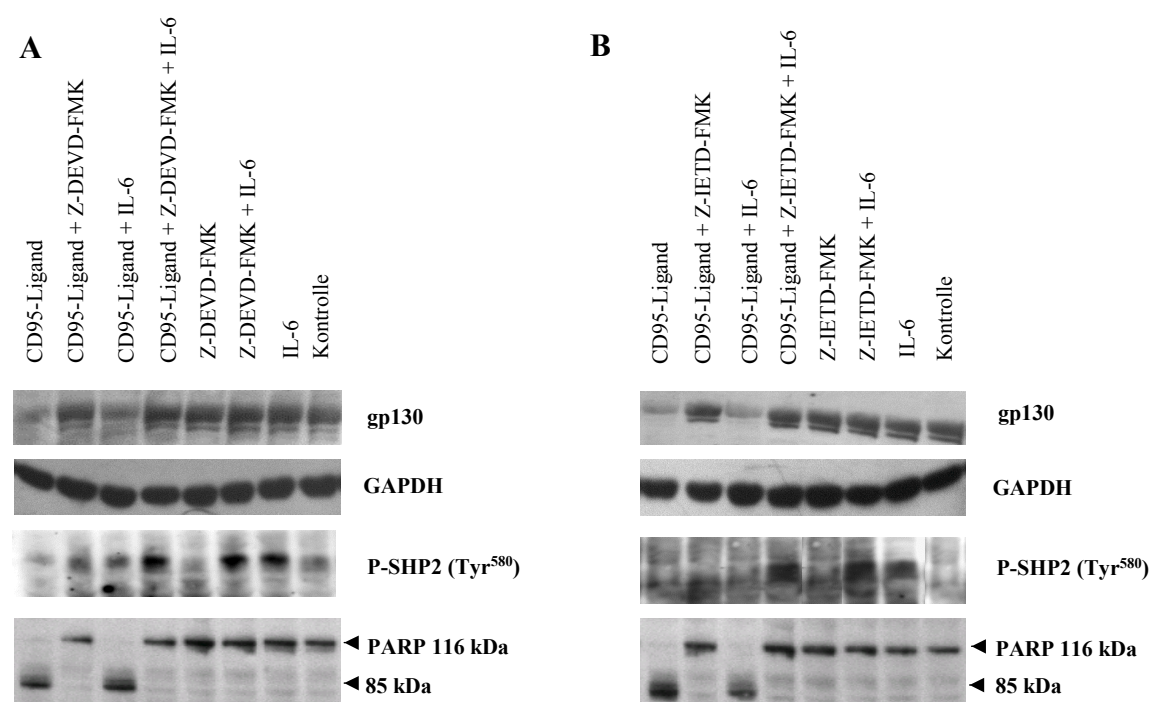


Abb. 3.6: Einfluss von Caspase-Inhibitoren auf die Phosphorylierung von SHP2 und die gp130-Expression in Anwesenheit des CD95-Liganden

Primäre Rattenhepatozyten wurden 3 h mit CD95-Ligand (100 ng/ml) inkubiert und anschließend mit IL-6 (10 ng/ml) für 20 min stimuliert. Falls angegeben, wurde für 30 min mit dem Caspase 3-Inhibitor Z-DEVD-FMK (**A**) oder mit dem Caspase 8-Inhibitor Z-IETD-FMK (**B**) (jeweils 50 μ M) vorinkubiert. 80 μ g des Gesamt-Protein-Extraktes wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet. Die Detektion von gp130, GAPDH, PARP und P-SHP2 (Tyr⁵⁸⁰) erfolgte mit spezifischen Antikörpern.

Eine Inhibition der Caspase 3-Aktivierung durch den Caspase 3-Inhibitor Z-DEVD-FMK verhinderte nicht nur die zuvor beschriebene Spaltung von PARP, sondern auch die Herabregulation des Rezeptors gp130 (Abb. 3.6). Auch die Zugabe des Caspase 8-Inhibitors

Z-IETD-FMK verhinderte das PARP-Cleavage sowie die Degradation von gp130. Die Inhibition der Caspase 3 oder Caspase 8 stellte ebenfalls die durch den CD95-Liganden vermittelte Inhibition der IL-6-vermittelten Phosphorylierung von STAT3 (Tyr⁷⁰⁵) [147] und SHP2 (Tyr⁵⁸⁰) wieder her (Abb. 3.6).

Das folgend aufgeführte *in vitro* Experiment bestätigte die Annahme, dass die GCDC- oder CD95-Ligand-induzierte Herabregulation von gp130 Caspase 3-abhängig war. Lysate von primären Rattenhepatozyten wurden wie unter 2.2.5 beschrieben mit oder ohne rekombinanter aktiver Caspase 3 für 2 h bei 37°C inkubiert (Abb. 3.7). Der Rezeptor gp130 war nach Zugabe der aktiven Caspase 3 kaum noch zu detektieren, hingegen blieb die Expression von gp80 und GAPDH unverändert. Auch das für 2 h bei 37°C inkubierte Kontroll-Lysat zeigte keine Änderung der Expression von gp130.

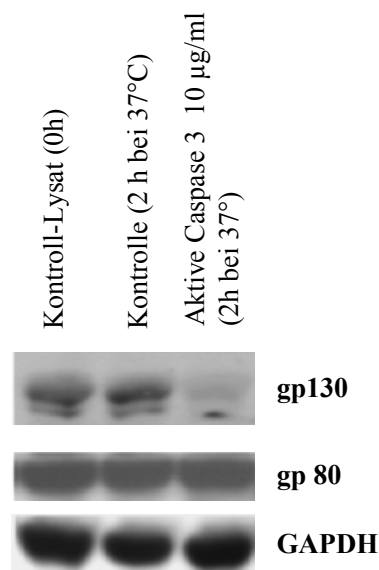


Abb. 3.7: Einfluss von aktiver Caspase 3 auf die gp130 Expression

24 h kultivierte primäre Rattenhepatozyten wurden lysiert und 100 µg Gesamt-Protein in einem Assay-Puffer mit aktiver Caspase 3 oder ohne (Kontrolle, 2 h bei 37°C) *in vitro* wie im Kapitel Material und Methoden unter 2.2.5 beschrieben für 2 h bei 37°C inkubiert. Kontroll-Lysat: 100 µg unbehandeltes Gesamt-Protein-Lysat. Die Proben wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Membran wurde mit spezifischen Antikörpern gegen gp80 und einen C-terminalen Abschnitt von gp130 detektiert. GAPDH wurde als Beladungskontrolle detektiert.

Caspasen gehören zur Familie der Cystein-Proteasen und erkennen in ihrem Substrat ein sich über vier Aminosäuren erstreckendes Motiv (vgl. Einleitung unter 1.6). Das bevorzugte Spaltmotiv für die Caspase 3 lautet DXXD. Analysen der Aminosäuresequenz von gp130 beim Menschen, der Maus und der Ratte zeigten, dass sich im C-terminalen Bereich des

gp130 zwei sich überlappende DXXD-Motive befinden. Beim menschlichen gp130 befindet sich dieses Aminosäuremotiv in der cytoplasmatischen Domäne zwischen den Positionen 800 und 806 mit der Sequenz DHVDGGD. Um herauszufinden, ob diese Aminosäuresequenz ein Spaltmotiv für die Caspase 3 ist, wurde der Aspartatrest der Position 803 (D803E) oder die zwei Aspartatreste der Positionen 803 und 806 (D803E/D806E) jeweils durch Glutamat ausgetauscht. Dies geschah durch das Einbringen von Punktmutationen in die codierende Sequenz (vgl. Abb. 2.1 unter 2.2.1.10). Damit zwischen dem Signalling der mutierten Rezeptoren und den endogenen Wildtyp-Rezeptoren unterschieden werden konnte, wurden die Zellen mit dem chimären Rezeptor Epo/gp130 transfeziert. Dieser besteht aus der extrazellulären Domäne des Erythropoetin (Epo) Rezeptors und der transmembran- und cytoplasmatischen Domäne des gp130 Rezeptors.

Die Zugabe von rekombinanter aktiver Caspase 3 zu den kompletten Zelllysaten von HepG2 Zellen, die mit dem Wildtyp Rezeptor Epo/gp130 transfeziert wurden, zeigten einen kompletten Verlust des Proteins Epo/gp130 (Abb. 3.8). Gleichzeitig wurde mit dem Antikörper, spezifisch gerichtet gegen den C-terminalen Teil von gp130, ein kleineres Fragment von ca. 18 kDa detektiert. Die Caspase 3-vermittelte Degradation von Epo/gp130 wurde durch die eingefügten Punktmutationen in das potentielle Spaltmotiv der Caspase 3 nahezu komplett verhindert. Diese Daten belegen, dass eine Caspase 3-vermittelte Spaltung in der Aminosäuresequenz 800-806 stattfand und zur Freisetzung eines 18 kDa großen C-terminalen Fragmentes führte. Eine Detektion des N-terminalen Fragmentes von gp130 war nicht möglich, da keine Antikörper vorhanden waren, die den extrazellulären Teil des Epo-Rezeptors erkennen. Alle von der Arbeitsgruppe verwendeten Antikörper, die gegen den N-terminalen Teil von gp130 gerichtet waren, waren für den Immunoblot und die Immunofluoreszenz unbrauchbar.

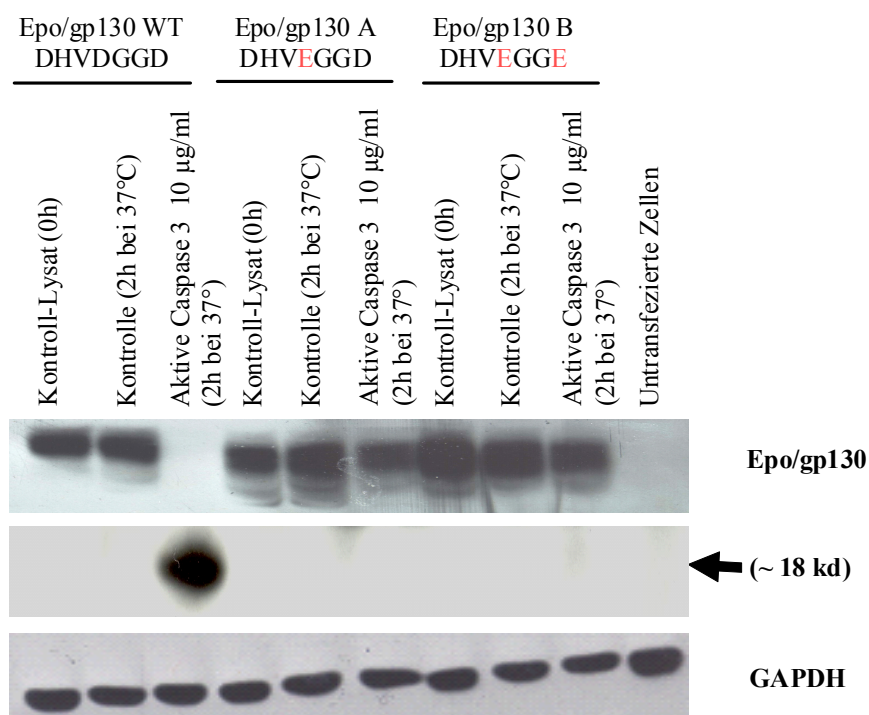


Abb. 3.8: Einfluss von Punktmutationen der AS 800-806 des gp130 auf die Caspase 3-abhängige Degradation

HepG2 Zellen wurden mit dem chimären Rezeptor Epo/gp130 und den zwei Mutations-Varianten Epo/gp130 AS 800-806: DHVEGGD und Epo/gp130 AS 800-806: DHVEGGE transfeziert (vgl. Abb. 2.1 unter 2.2.1.10 und Beschreibung im Text). Die Zelllysate wurden mit rekombinanter aktiver Caspase 3 für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Reaktionsansätze im Western Blot mit einem Antikörper detektiert, der die C-terminale Domäne des gp130-Rezeptors erkennt. Spezifische Banden wurden auf der erwarteten Höhe für Epo/gp130 bei ca. 75 kDa und bei der Wildtyp-Form von Epo/gp130 zusätzlich bei 18 kDa detektiert. GAPDH diente als Beladungskontrolle.

Als nächstes wurde die Bedeutung des *in vitro* identifizierten Spaltmotives für die Caspase-vermittelte Degradation von gp130 in der Zellkultur untersucht. Da primäre Hepatozyten eine niedrige Transfektionsrate haben, wurden die humane Hepatoma Zelllinie HepG2 und die Maus Fibroblasten Zelllinie NIH-3T3 als Modell-Systeme verwendet. Im Gegensatz zu primären Ratten-Hepatozyten sind HepG2 Zellen resistent gegenüber CD95-Ligand-induzierter Apoptose. Nur die Kombination von CD95-Ligand und Cycloheximid resultiert in einer Apoptose [148]. Da jedoch eine Herabregulation von gp130 durch Cycloheximid aufgrund einer inhibierten Translation nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden die Experimente in NTCP-transfezierten HepG2 Zellen unter Stimulation mit GCDC durchgeführt, welches bekanntlich eine Apoptose und eine Caspase 3-Aktivierung hervorruft (vgl. Einleitung unter 1.6.1 und Abb. 3.9 B). Darüber hinaus wurden NIH-3T3 Zellen mit 1 µM Staurosporin (STS) inkubiert, das in diesen Zellen Apoptose und eine Caspase 3-Aktivierung vermittelt [149] (und vgl. Abb. 3.9 A).

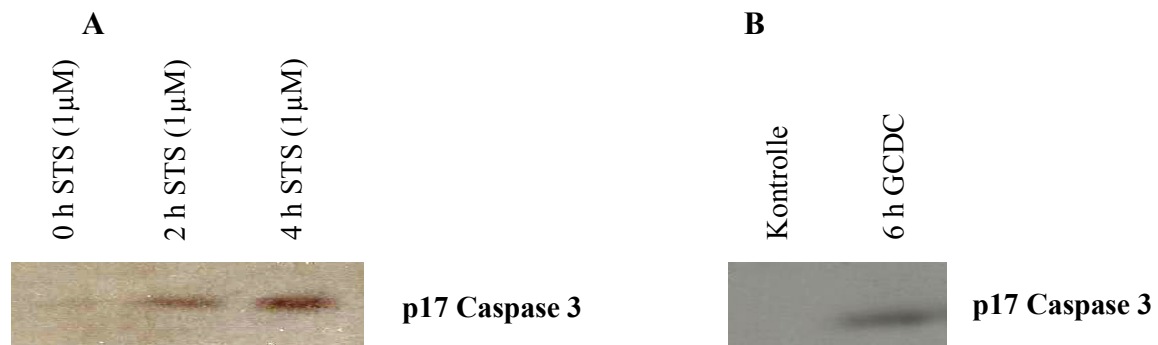


Abb. 3.9: Nachweis der Caspase 3-Aktivierung durch Staurosporin und Gallensäuren

(A) NIH-3T3 Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 1 μ M Staurosporin (STS) inkubiert. (B) NTCP-HepG2 Zellen wurden für 6 h ohne (Kontrolle) oder mit 100 μ M GCDC inkubiert. 80 μ g des hergestellten Gesamt-Protein-Extraktes wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot erfolgte die Detektion mit spezifischen Antikörpern gegen p17 Caspase 3.

Abb. 3.10 A zeigt, dass Staurosporin die Expression des chimären Epo/gp130-Rezeptors (Wildtyp) in transfezierten NIH-3T3 Zellen herabregulierte. Diese Herabregulation wurde durch die eingebrachten Punktmutationen in das oben beschriebene Spaltmotiv größtenteils verhindert. Die IL-6-induzierte Phosphorylierung von STAT3 wurde nicht untersucht, da Staurosporin ein potenter Inhibitor von Tyrosin-Kinasen wie JAK1 ist [150], welche für die Phosphorylierung der STAT-Elemente verantwortlich sind.

NTCP-HepG2 Zellen, die mit dem Wildtyp Epo/gp130 transfeziert waren, wurden mit GCDC stimuliert. Dies führte zu einer starken Herabregulation der Epo/gp130-Expression (Abb. 3.10 B). Die durch Epo induzierte Phosphorylierung von STAT3 wurde durch GCDC inhibiert. NTCP-HepG2 Zellen, die mit dem mutierten chimären Rezeptor (EpoR/gp130 800-806 DHV**E**GGD und EpoR/gp130 DHV**E**GG**E**) transfeziert waren, zeigten eine deutlich verminderte Herabregulation des Epo/gp130 durch GCDC. Obwohl die Expression des Epo/gp130-Rezeptors in Gegenwart von GCDC größtenteils wiederhergestellt wurde, blieb die Epo-induzierte Phosphorylierung von STAT3 durch die mutierten Rezeptoren unbeeinflusst.

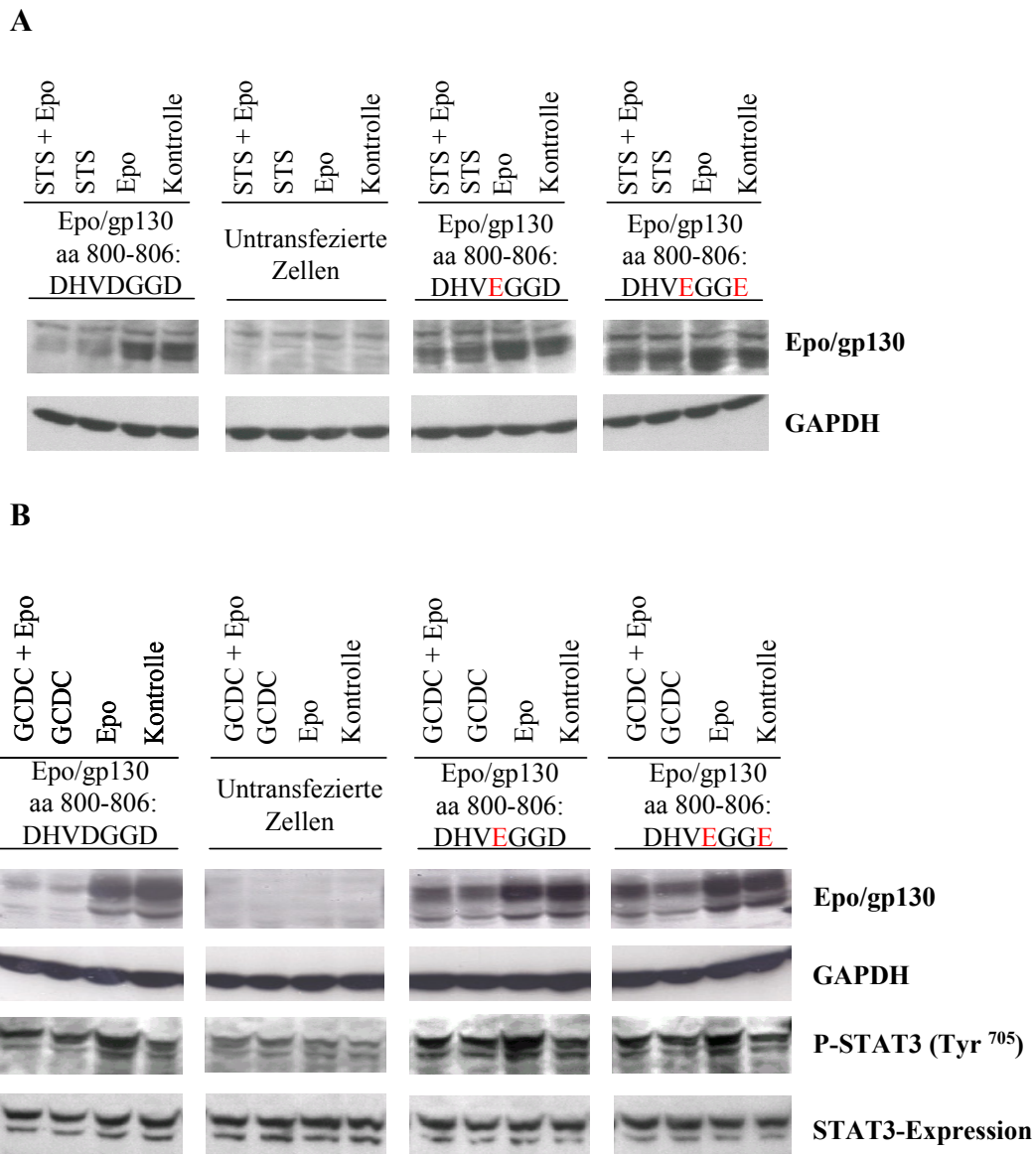


Abb. 3.10: Caspase-abhängige Spaltung des Epo/gp130 in Zellkultur

NIH-3T3 Zellen (A) oder NTCP-transfizierte HepG2 Zellen (B) wurden mit Epo/gp130 oder den zwei Mutations-Varianten Epo/gp130 AS 800-806: DHVEGGD und Epo/gp130 AS 800-806: DHVEGGE transfiziert. Nach 48 h Expressionszeit wurden die NIH-3T3 Zellen mit 1 μ M Staurosporin (STS) (A) und die NTCP-HepG2 Zellen mit 100 μ M GCDC (B) inkubiert und anschließend mit 1 U/ml Erythropoetin (Epo) für 20 min stimuliert. 60 μ g Gesamt-Protein-Extrakt wurden im Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen den C-terminalen Teil von gp130 und ist gegen phosphospezifisches STAT3 (Tyr⁷⁰⁵) gerichtet. Die GAPDH und STAT3-Expression wurde zur Überprüfung der Beladung detektiert.

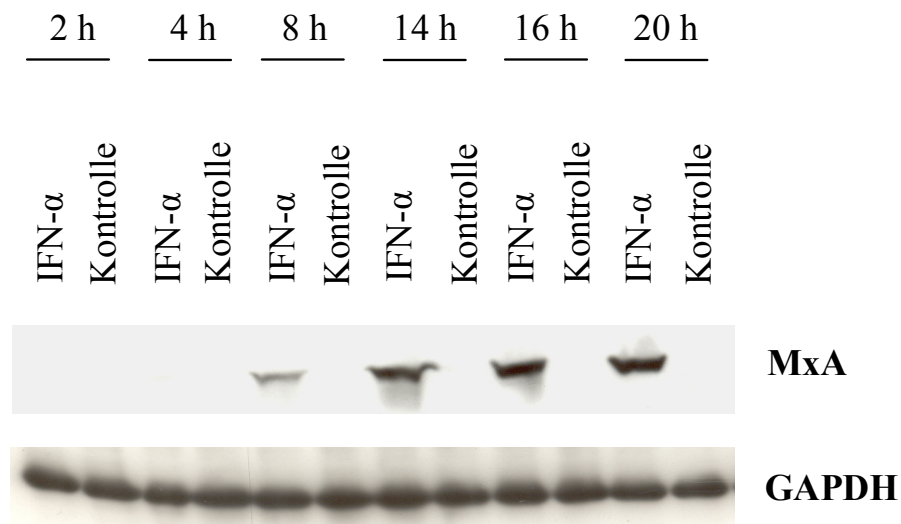
3.2 Modulation der IFN- α -abhängigen Signaltransduktion und Expression antiviraler Proteine

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von hyperosmotischem Stress und hydrophoben Gallensäuren auf die IFN- α -induzierte Signaltransduktion und antivirale Antwort untersucht.

3.2.1 Effekt von pro-apoptotischen Stimuli und Betain auf die IFN- α -induzierte Proteinexpression

Zunächst wurde die Zeitabhängigkeit der IFN- α -induzierten MxA-(Myxovirus resistance protein A) Protein- und mRNA-Expression in HepG2 Zellen untersucht (Abb. 3.11). Dazu wurden HepG2 Zellen für die angegebenen Zeitpunkte mit 1500 U/ml IFN- α stimuliert. Das MxA-Protein war nach 8 h IFN- α -Stimulation detektierbar und stieg in seiner Expression kontinuierlich an. Im Gegensatz dazu wurde die mRNA von MxA in zwei Stufen reguliert mit einem Maximum nach 4 h und nach 14-16 h IFN- α -Stimulation.

A



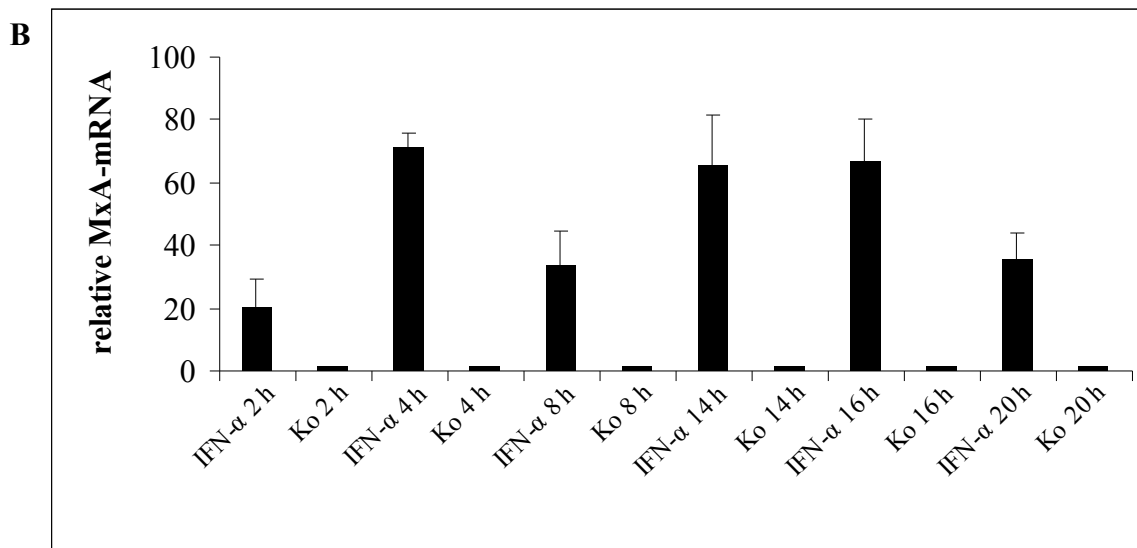


Abb. 3.11: Zeitabhängigkeit der IFN- α -induzierten MxA-Expression

HepG2 Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte unbehandelt gelassen (Kontrolle) oder mit 1500 U/ml IFN- α stimuliert. **(A)** Die Zellen wurden lysiert, 60 μ g Protein des Gesamt-Lysates in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Detektion der Proteine MxA und GAPDH (als Beladungskontrolle) erfolgte mittels spezifischer Antikörper. **(B)** Die Zellen wurden für eine RNA-Präparation lysiert und nachfolgend die mRNA-Level in einer RT-PCR mit spezifischen Primern für humanes MxA und humanes HPRT1 (als endogene Kontrolle) analysiert. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta$ CT Methode berechnet [133-135]. Dargestellt sind die relativen mRNA-Level in Relation zur unstimulierten Kontrolle, die als 1 gesetzt wurde. Mittelwerte $\pm$ SEM; n = 3.

Um den Einfluss von hyperosmotischem Stress auf die IFN- α -induzierte antivirale Antwort zu untersuchen, wurden HepG2 Zellen mit normoosmotischem (305 mosmol/L), hyperosmotischem (405/ 505 mosmol/L) oder hypoosmotischem (205 mosmol/L) Medium für 6 h vorinkubiert und anschließend 20 h mit 1500 U/ml IFN- α stimuliert. Die Expression der IFN- α -induzierten Proteine MxA und PKR (dsRNA activated protein kinase) wurde im Western-Blot detektiert (Abb. 3.12). Hyperosmolares Medium mit einer Osmolarität von 405 mosmol/L regulierte die IFN- α -induzierte MxA-Expression, sowie die konstitutive und die IFN- α -induzierte PKR-Expression herunter. Hyperosmolares Medium mit einer Osmolarität von 505 mosmol/L verstärkte diesen Effekt, während hypoosmolares Medium mit 205 mosmol/L die Expression von MxA und PKR nicht veränderte. Die Expression der GAPDH blieb unter allen Bedingungen unverändert.

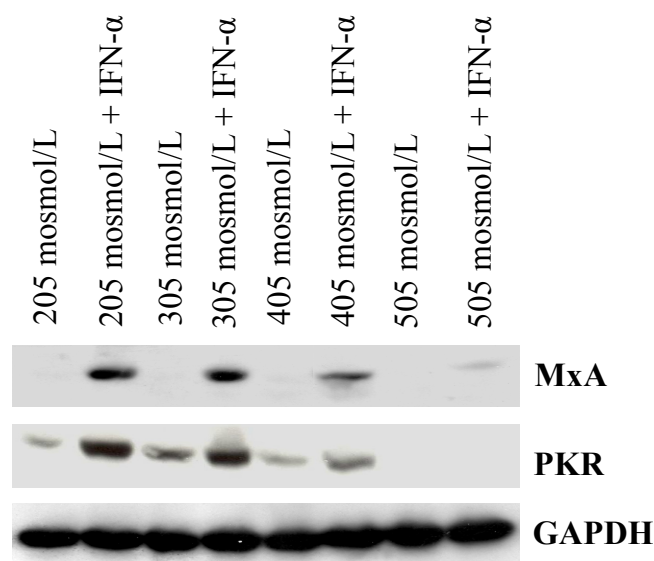


Abb. 3.12: Expression der IFN- α -induzierten Proteine MxA und PKR unter hyperosmotischen Bedingungen

HepG2 Zellen wurden für 6 h mit hypoosmotischem (205 mosmol/L), normoosmotischem (305 mosmol/L) oder hyperosmotischem (405/ 505 mosmol/L) Medium vorinkubiert und anschließend 20 h mit 1500 U/ml IFN- α stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, das Gesamt-Protein-Extrakt generiert und anschließend erfolgte die Detektion der Proteine MxA, PKR und GAPDH (als Beladungskontrolle) im Western Blot mittels spezifischer Antikörper.

Betain ist ein organisches Osmolyt und wird unter dem Einfluss von hyperosmotischem Stress in der Zelle akkumuliert. Es hat zytoprotektive sowie antioxidative Eigenschaften und kann als Chaperon wirken (vgl. Einleitung unter 1.7). Eine 12 h Inkubation der Zellen mit Betain vor der Stimulation mit hyperosmotischem Medium stellte die MxA-Expression wieder her. Dabei war eine Konzentration von 5 mM Betain notwendig, während 1 mM Betain noch keinen Effekt zeigte (Abb. 3.13).

Des Weiteren wurde der Einfluss von hydrophoben Gallensäuren auf die IFN- α -induzierte MxA-Expression in NTCP-transfzierten HepG2 Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit 300 μ M GCDC (Glycochenodeoxycholsäure) oder TCDC (Taurochenodeoxycholsäure) für 6 h vorinkubiert und anschließend für 20 h mit 1500 U/ml IFN- α stimuliert. Die IFN- α -induzierte Expression von MxA wurde durch 300 μ M GCDC oder TCDC stark reduziert (Abb. 3.14). Auch hier war Betain in der Lage, die Gallensäuren-vermittelte Inhibition der MxA-Expression wiederherzustellen. Im Gegensatz dazu konnten diese Gallensäuren in HepG2-Zellen, die nicht mit dem NTCP transfiziert waren, keine Herabregulation der MxA-Expression nach Stimulation mit IFN- α bewirken (Daten nicht gezeigt).

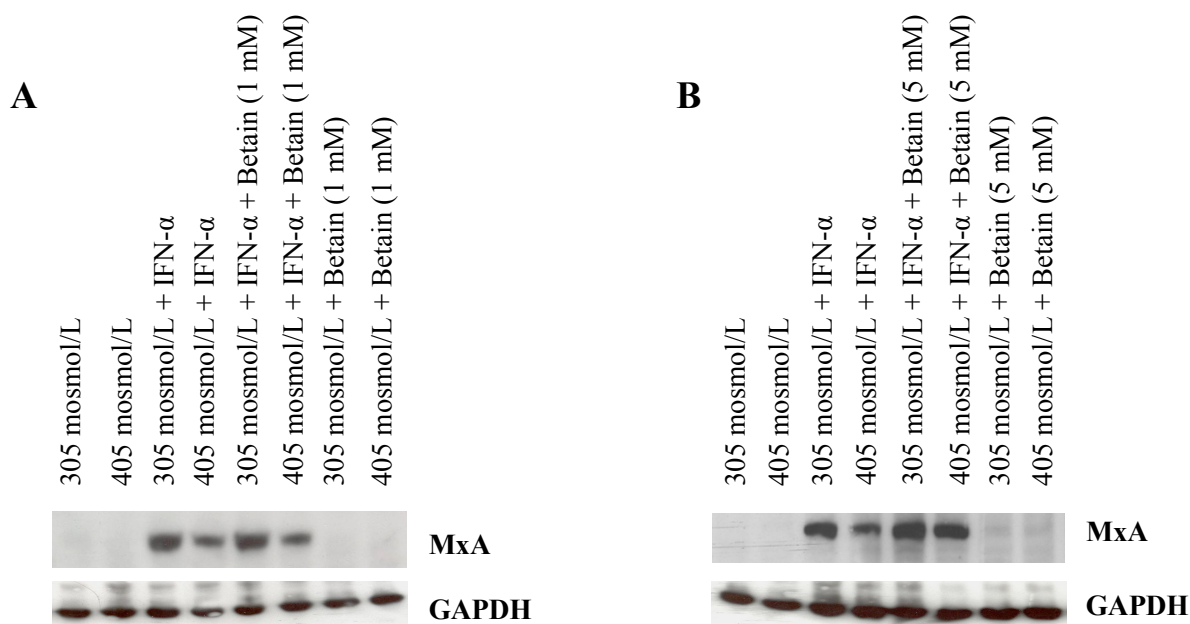


Abb. 3.13: Einfluss von Betain auf die hyperosmotisch vermittelte Herabregulation der MxA-Expression
 HepG2 Zellen wurden 12 h mit 1 mM (A) oder 5 mM (B) Betain vorinkubiert. Nach 6 h Inkubation mit normosmotischem (305 mosmol/L) oder hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium wurden die Zellen mit 1500 U/ml IFN- α für 20 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und 60 μ g des Gesamt-Protein-Extraktes im Western Blot auf die Expression der Proteine MxA und GAPDH (zur Beladungskontrolle) hin analysiert. Für die Detektion wurden spezifische Antikörper verwendet.

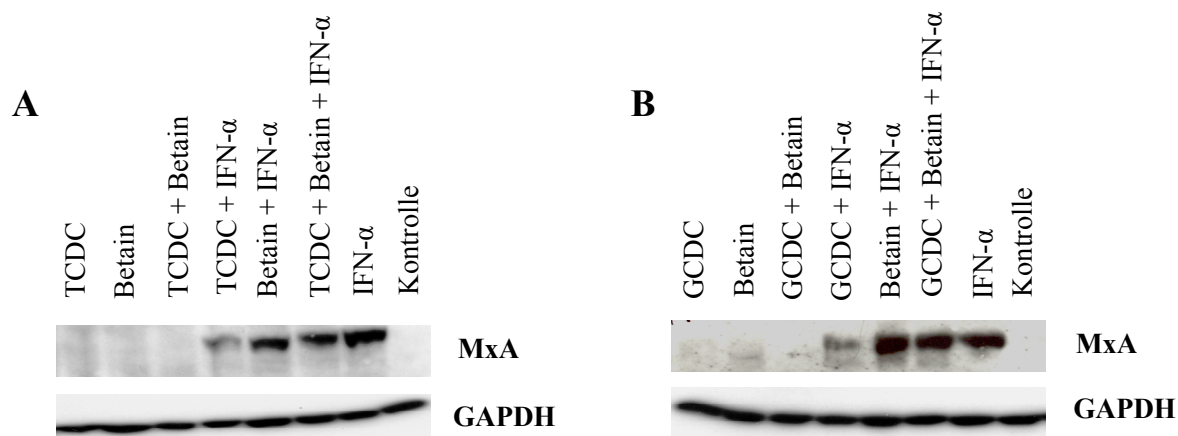


Abb. 3.14: Einfluss von Gallensäuren und Betain auf die IFN- α -induzierte MxA-Expression
 NTCP-transfizierte HepG2 Zellen wurden mit 5 mM Betain für 12 h vorinkubiert und anschließend mit den Gallensäuren (A) TCDC (300 μ M) oder (B) GCDC (300 μ M) für weitere 6 h inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 1500 U/ml IFN- α stimuliert. Die Detektion der Proteine MxA und GAPDH erfolgte im Western Blot.

Um zu überprüfen, ob die Herabregulation der IFN- α -induzierten MxA-Expression unter Gallensäuren-Stimulation ein generelles Phänomen ist und auch in immunkompetenten Zellen auftritt, wurde der Einfluss von hydrophoben Gallensäuren auf die in Monozyten und Makrophagen durch IFN- α -induzierte MxA-Expression analysiert. Dazu wurden aus

humanem peripherem Blut mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert und diese mit dem Wachstumsfaktor M-CSF zu Makrophagen ausdifferenziert. Da bei diesen Zellen die Aufnahme von konjugierten Gallensäuren ungeklärt ist, wurden sie mit der unkonjugierten Gallensäure Chenodeoxycholsäure (CDC) stimuliert, die mutmaßlich über die Membran aufgenommen werden kann. Eine Inkubation von 200 μ M CDC über 6 h regulierte die IFN- α -induzierte Expression von MxA herab (Abb. 3.15 A und 3.15 C). Betain konnte die in PBMC durch CDC-inhibierte Expression von MxA wiederherstellen (Abb. 3.15 B).

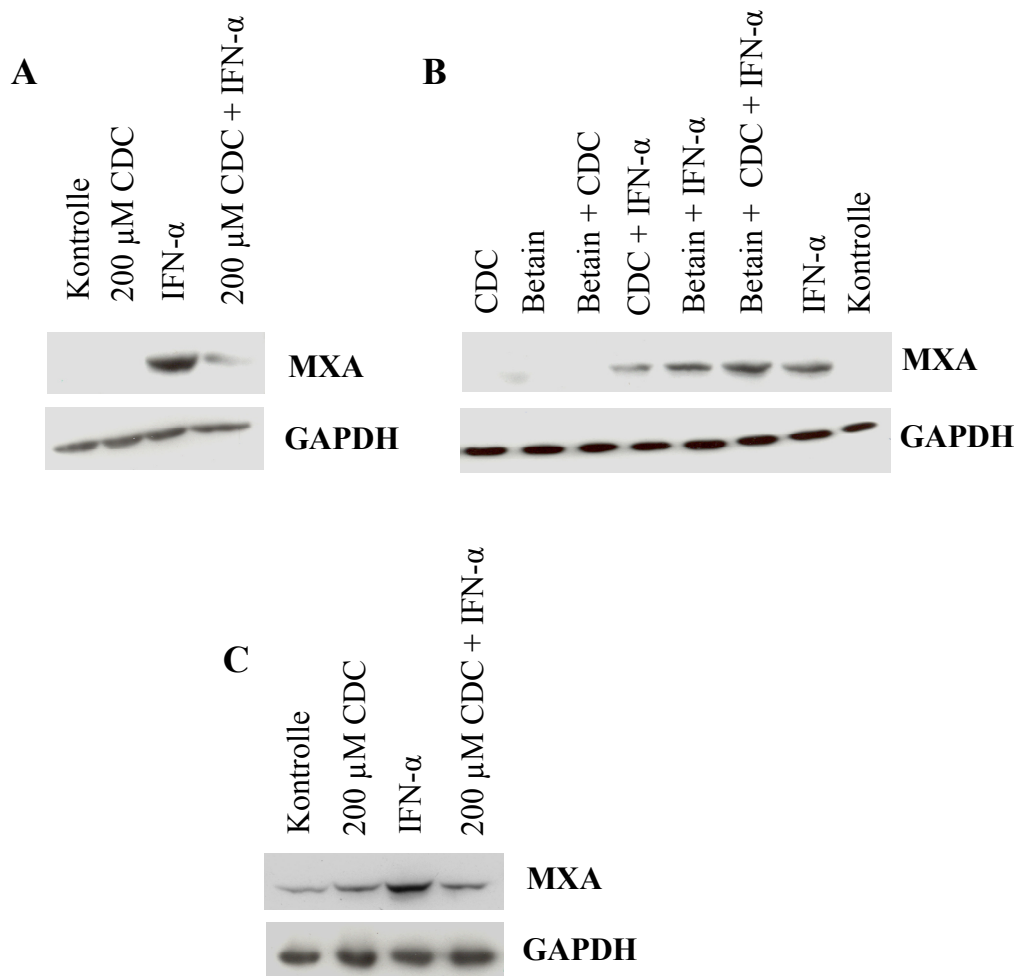


Abb. 3.15: Einfluss der hydrophoben Gallensäuren CDC auf die IFN- α -induzierte MxA Expression in PBMC und Makrophagen

Aus humanem peripherem Blut isolierte mononukleäre Zellen (PBMC) (**A**, **B**) oder primäre humane Makrophagen, die über M-CSF aus PBMC ausdifferenziert wurden (**C**), wurden 6 h mit der Gallensäure CDC (200 μ M) inkubiert und anschließend mit 100 U/ml IFN- α für 20 h stimuliert. (**B**) Die PBMC wurden mit 5 mM Betain präinkubiert. 60 μ g des Gesamt-Protein-Extraktes wurden elektrophoretisch in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Spezifische Antikörper gegen MxA oder GAPDH (als Beladungskontrolle) dienten der Detektion.

Für Gallensäuren wurde gezeigt, dass sie die Hepatitis-C-Virus (HCV) oder Hepatitis-B-Virus (HBV) Replikation über den Gallensäurenrezeptor *farnesoid X receptor* (FXR) steigern. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss des FXR-Agonisten GW4064 auf die IFN- α -induzierte MxA-Expression untersucht (vgl. Abb. 3.16). Eine Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen GW4064 hatte keinen Einfluss auf die MxA-Expression.

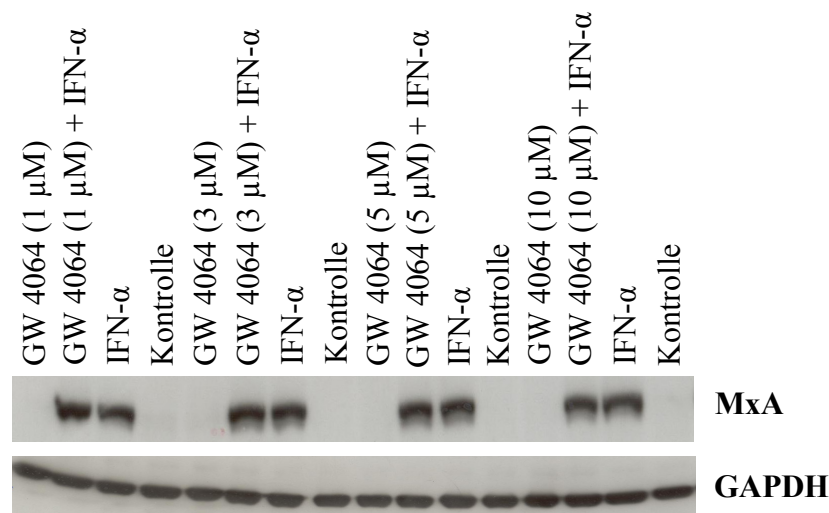


Abb. 3.16: Einfluss des FXR Agonisten GW4064 auf die IFN- α -induzierte MxA-Expression

NTCP-HepG2 Zellen wurden für 6 h mit den angegebenen Konzentrationen des FXR Agonisten GW4064 inkubiert und anschließend für 20 h mit 1500 U/ml IFN- α stimuliert. Die Zelllysate wurden wie oben beschrieben für die Detektion von MxA und GAPDH verwendet.

Im Gegensatz zu Betain hatten andere Osmolyte wie Taurin (5 mM) oder Myoinositol (5 mM) keinen Einfluss auf die hyperosmotisch-bedingte Verminderung der MxA-Expression (Abb. 3.17). Betain dient in der Zelle auch als Methylgruppen-Donor und ist der Auslöser für die Reaktion von Homozystein zu Methionin durch die Betain-Homozystein-Methyltransferase (BHMT). Im folgenden Schritt wird Methionin durch die Methionin-Adenosyl-Transferase (MAT) zu S-Adenosylmethionin (SAM) umgewandelt, wobei Magnesium und Adenosintriphosphat (ATP) als Co-Faktoren dienen [151-155]. Eine 12 h Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen an SAM (100 μ M/ 300 μ M/ 1 mM/ 2 mM/ 5 mM) stellte die herabregulierte MxA-Expression jedoch nicht wieder her (Abb. 3.17 und Tab. 3.1). Ebenso hatte Methionin keinen Einfluss auf die Protein-Expression von MxA (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Inhibitoren ohne einen Effekt auf die hyperosmotisch-vermittelte Herabregulation der IFN- α -induzierten MxA Expression

Substanz	Konzentration	Eigenschaft, Funktion
Apocynin	300 μ M	Inhibitor der NADPH Oxidase
Bafilomycin A	250 μ M	Inhibitor der lysosomalen Ansäuerung
Calyculin A	5 nM	Serin-/ Threonin-Phosphatase-Inhibitor
Cholinchlorid	1 mM/ 5 mM / 10 mM	Wird in der Zelle zu Betain oxidiert
Epigallocatechin Gallat	30 μ M	Antioxidanz
Genestein	10 μ M	Tyrosin-Kinase-Inhibitor
Gö6976	10 μ M	Inhibitor der Protein Kinase C
Methionin	500 μ M/ 1 mM/ 5 mM	Kann durch Verknüpfung mit ATP zu SAM umgesetzt werden
MG132	25 μ M	Proteasomen-Inhibitor
Myoinositol	5 mM	Osmolyt
N-acetyl-l-cystein	30 mM	Antioxidanz
Okadainsäure	20 nM	Serin-/ Threonin-Phosphatase-Inhibitor
PD098059	10 μ M	Inhibitor von MEK1
SB220025	10 μ M	Inhibitor von p38 ^{MAPK}
SAM	100 μ M/ 300 μ M/ 1 mM/ 2 mM/ 5 mM	Methyl-Gruppen Donor
Taurin	5 mM	Osmolyt
Trolox	50 μ M/ 100 μ M/ 500 μ M	Antioxidanz
Z-DEVD-FMK	50 μ M	Caspase 3-Inhibitor
Z-IETD-FMK	50 μ M	Caspase 8-Inhibitor

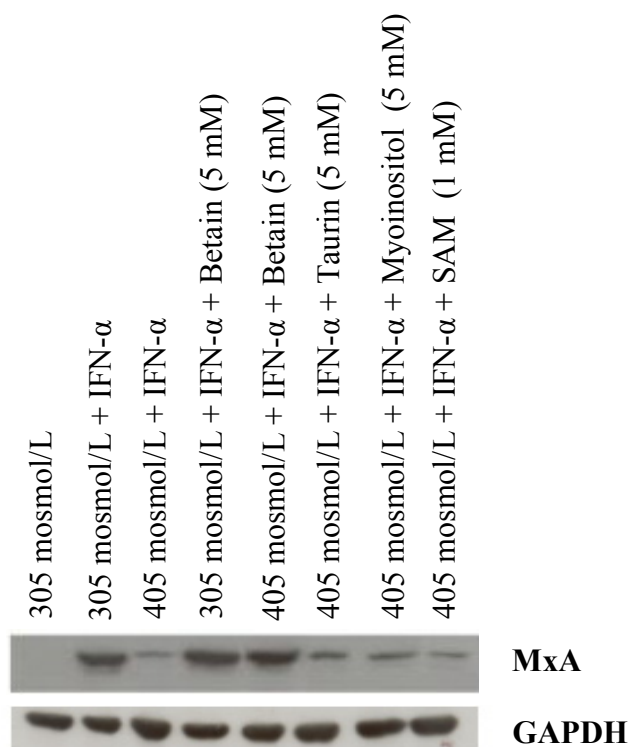


Abb. 3.17: Einfluss von Betain, Taurin, Myoinositol und SAM auf die herabregulierte MxA-Expression
 HepG2 Zellen wurden für 12 h mit den Osmolyten Betain, Taurin, Myoinositol (je 5 mM) oder dem Methyl-Gruppen Donor S-Adenosylmethionin (SAM) (1mM) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit normoosmotischem (305 mosmol/L) oder hyperosmotischem (405 mosmol/L) Medium für 6 h kultiviert und danach mit 1500 U/ml IFN-α für weitere 20 h stimuliert. 60 µg Gesamt-Protein wurden mit Hilfe des Western Blots auf die Expression von MxA und GAPDH analysiert.

3.2.2 Molekulare Mechanismen der hyperosmotisch-induzierten Inhibition der MxA-Transkription

Um den inhibierenden Effekt von hyperosmotischem Stress oder Gallensäuren auf die IFN-α-induzierte MxA-Expression näher zu charakterisieren, wurden Studien mit verschiedenen Inhibitoren durchgeführt. Wegen der zahlreichen Versuchsansätze wurden diese Substanzen nur unter dem Einfluss von hyperosmotischem Stress untersucht. Zunächst wurde die Beteiligung der lysosomalen und proteasomalen Proteolyse analysiert. Bafilomycin A (250 nM) inhibiert die lysosomale Ansäuerung und somit die lysosomale Degradation. Die Rolle des Proteasoms wurde durch Verwendung des spezifischen Inhibitors MG132 untersucht. Beide Inhibitoren hatten keinen Einfluss auf die hyperosmotisch-induzierte Abnahme der MxA-Expression (Tab. 3.1). Im Fall für die IL-6-induzierte STAT3 Inhibition durch Gallensäuren wurde eine Caspase 3-abhängige Spaltung des gp130 Rezeptors identifiziert (vgl. 3.1). Caspase 3 oder 8 Inhibitoren modulierten jedoch nicht die IFN-α-induzierte MxA-Expression. Hyperosmolarität und Gallensäuren induzieren über die NADPH Oxidase

oxidativen Stress [94, 131]. Allerdings hatten weder die Inhibition der NADPH Oxidase durch Apocynin noch die Inkubation mit Antioxidantien wie Trolox, N-acetyl-L-cystein (NAC) oder Epigallocatechin gallat (EGCG) einen Einfluss auf die hyperosmotisch-induzierte Abnahme der MxA-Expression. Eine Inhibition der MAPK wie ERK 1/2 oder der $p38^{\text{MAPK}}$, die in die Signaltransduktion von Gallensäuren und Hyperosmolarität involviert sind, durch die spezifischen Inhibitoren PD098059 oder SB220025 hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die MxA-Expression. Alle verwendeten Inhibitoren sind in Tab. 3.1 vollständig unter Angabe der eingesetzten Konzentrationen aufgelistet.

Als nächstes wurde die Expression der MxA-mRNA unter hyperosmotischen Bedingungen analysiert. Dazu wurden die mRNA-Level der MxA-Expression in einer RT-PCR näher untersucht. HepG2 Zellen wurden mit 305 mosmol/L oder 405 mosmol/L für 6 h kultiviert und anschließend mit 1500 U/ml IFN- α stimuliert. Nach 12 h Inkubationszeit wurden die Zellen für eine RNA-Präparation lysiert und mittels RT-PCR analysiert. In Abb. 3.18 ist gezeigt, dass die Inkubation mit 405 mosmol/L die mRNA von MxA um ca. 30 % signifikant im Vergleich zu normoosmotischen Bedingungen reduzierte.

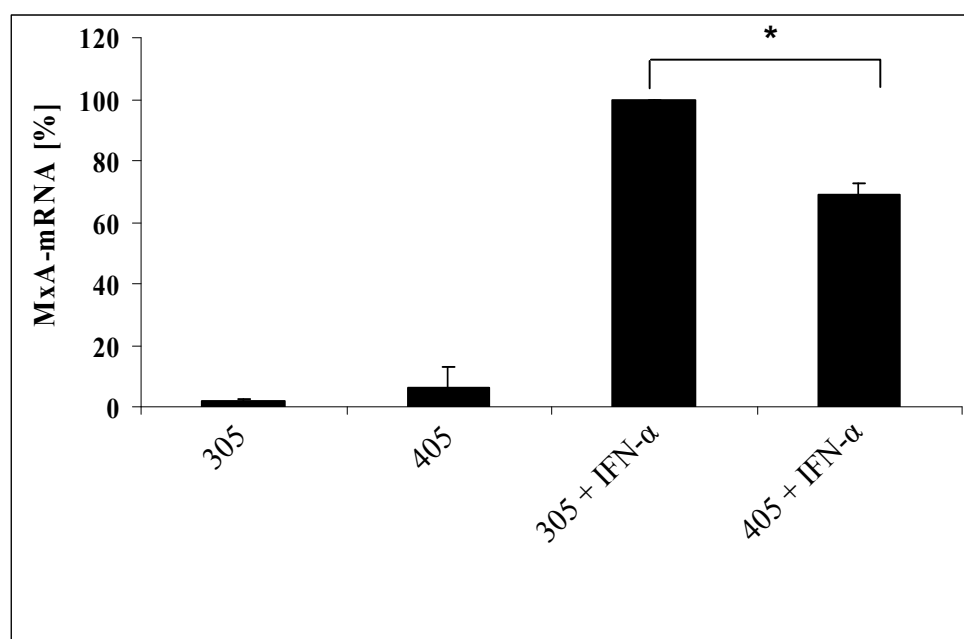


Abb. 3.18: Einfluss von hyperosmotischem Stress auf die IFN- α -induzierte MxA-mRNA

HepG2 Zellen wurden für 6 h mit 305 mosmol/L oder 405 mosmol/L vorinkubiert und nachfolgend für 12 h mit IFN- α (1500 U/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, es wurde eine RNA-Präparation durchgeführt und in einer RT-PCR die mRNA-Level für MxA und HPRT1 (als endogene Kontrolle) analysiert. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode berechnet [133-135]. Dargestellt sind die relativen mRNA-Level in Relation zur IFN- α stimulierten Kontrolle unter normoosmotischen Bedingungen, die als 100 % gesetzt wurde. Mittelwerte $\pm$ SEM; n = 3; * signifikant unterschiedliche Expression ($p < 0,05$).

Um einen destabilisierenden Effekt von hyperosmotischem Stress auf die MxA-mRNA auszuschließen, wurden Experimente mit dem Transkriptions-Inhibitor Aktinomyzin D durchgeführt (Abb. 3.19). Zunächst wurde IFN- α (1500 U/ml) für 14 h vorinkubiert, um ein gleichmäßiges Level an MxA-mRNA zu induzieren. Dann wurden die Osmolaritäten von 305 mosmol/L und 405 mosmol/L durch die Zugabe einer definierten Menge an NaCl eingestellt, gleichzeitig Aktinomyzin D (5 μ g/ml) zugegeben und für die angegebenen Zeitpunkte inkubiert. Erwartungsgemäß nahm die MxA-mRNA durch die Inkubation mit Aktinomyzin D signifikant ab. Auch eine Osmolarität von 405 mosmol/L alleine reduzierte die MxA-mRNA um ein ähnliches Maß wie Aktinomyzin D. Die Kombination von Aktinomyzin D und 405 mosmol/L hatte jedoch keinen synergistischen Effekt auf die Abnahme der MxA-mRNA. Daher scheint als Ursache für die reduzierte MxA-Expression eher eine inhibierte Transkription als eine vermehrte Destabilisierung der mRNA in Frage zu kommen.

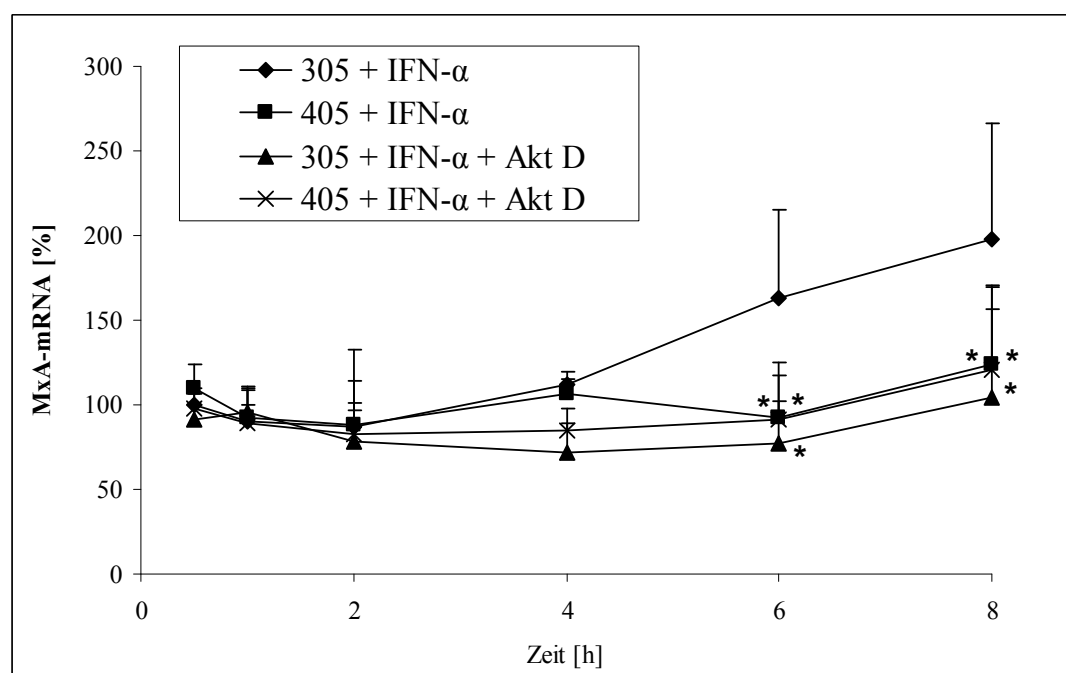


Abb. 3.19: Einfluss von hyperosmotischem Stress auf die IFN- α -induzierte MxA-mRNA

HepG2 Zellen wurden für 12 h mit IFN- α (1500 U/ml) vorinkubiert. Danach wurden die Zellen mit 305 mosmol/L oder 405 mosmol/L und 5 μ g/ml Aktinomyzin D zeitgleich für die entsprechenden Zeitpunkte inkubiert und nachfolgend für eine RNA-Präparation lysiert. In einer RT-PCR wurden die mRNA-Level für MxA und HPRT1 (als endogene Kontrolle) analysiert. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta$ CT Methode berechnet [133-135]. Dargestellt sind die relativen mRNA-Level in Relation zur IFN- α stimulierten Kontrolle unter normoosmotischen Bedingungen (305 mosmol/L) zum Zeitpunkt 30 min, die als 100 % gesetzt wurde. Mittelwerte $\pm$ SEM; n = 4; * Relative MxA mRNA-Level zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu den IFN- α -stimulierten Kontrollen unter normoosmotischen Bedingungen.

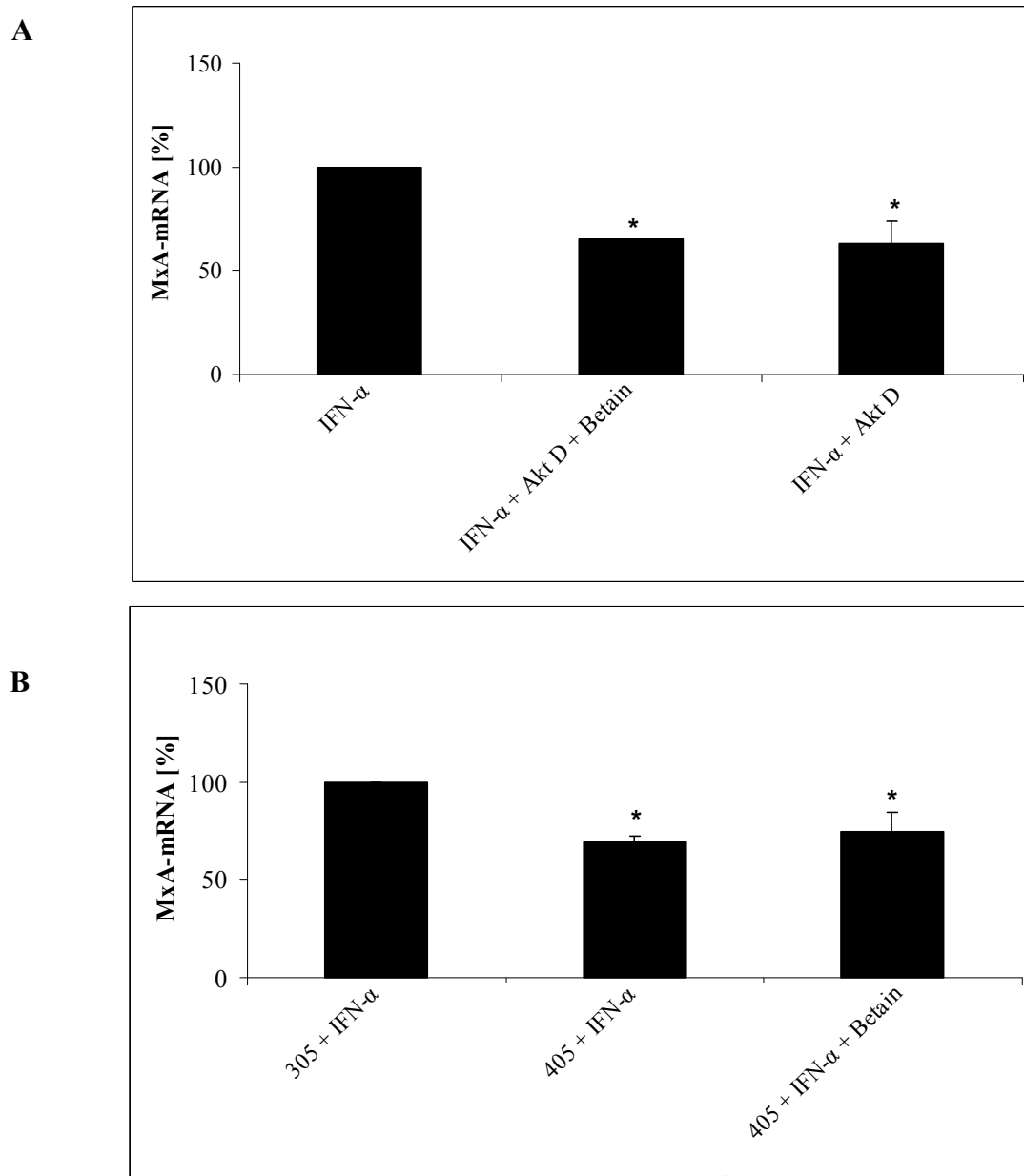


Abb. 3.20: Einfluss von Betain auf die durch hyperosmotischen Stress oder Aktinomyzin D bedingte IFN- α -induzierte MxA-mRNA

HepG2 Zellen wurden für 12 h mit 5 mM Betain präinkubiert und anschließend für 12 h mit IFN- α (1500 U/ml) stimuliert. Danach erfolgt eine Inkubation mit 5 μ g/ml Aktinomyzin D (**A**) oder mit 405 mosmol/l (**B**) für 8 h. Die Zellen wurden lysiert und für eine RT-PCR die RNA-Extrakte generiert. Für die RT-PCR wurden spezifische Primer für humanes MxA und für humanes HPRT1 (als endogene Kontrolle) verwendet. Dargestellt sind jeweils die relativen mRNA-Level in Relation zur IFN- α stimulierten Kontrolle unter normoosmotischen Bedingungen (305 mosmol/L), die als 100% gesetzt wurde. Mittelwerte $\pm$ SEM; n = 4; * Relative MxA mRNA-Level zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu der IFN- α -stimulierten Kontrolle unter normoosmotischen Bedingungen.

Nun wurde überprüft, ob Betain einen stabilisierenden Effekt auf die MxA-mRNA hatte oder die Transkription steigerte. Für diese Untersuchung wurden HepG2 Zellen nach einer 12 h Vorinkubation mit 5 mM Betain zusätzlich mit 1500 U/ml IFN- α stimuliert. Anschließend wurden die Zellen für 8 h mit dem Transkriptions-Inhibitor Aktinomyzin D (Abb. 3.20 A)

oder hyperosmotischem Medium (405 mosmol/L) (Abb. 3.20 B) inkubiert. Die mRNA von MxA war nach der Inkubation mit Aktinomycin D oder 405 mosmol/L wie oben beschrieben (Abb. 3.18 und 3.19) um ca. 30 % reduziert. Eine Vorinkubation mit Betain hatte hierbei in beiden Fällen keinen Einfluss auf die MxA-mRNA.

3.2.3 Einfluss pro-apoptotischer Stimuli auf die IFN- α -induzierte STAT1/2 Phosphorylierung

Um den molekularen Mechanismus, der der reduzierten Transkription von MxA zu Grunde liegt, zu identifizieren, wurde die Phosphorylierung der STAT-Elemente analysiert. Abb. 3.21 zeigt die durch IFN- α -induzierte Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 (Tyr⁷⁰¹) und STAT2 (Tyr⁶⁹⁰) nach 20 min Inkubation mit 1500 U/ml IFN- α in HepG2 Zellen. Eine Vorinkubation mit hyperosmotischem Medium (405 mosmol/L oder 505 mosmol/L) für 6 h inhibierte die STAT1- und STAT2-Phosphorylierung. Betain konnte die Expression des IFN- α -induzierten MxA-Proteins wiederherstellen, war aber nicht in der Lage, die Phosphorylierung unter hyperosmotischen Bedingungen wiederherzustellen.

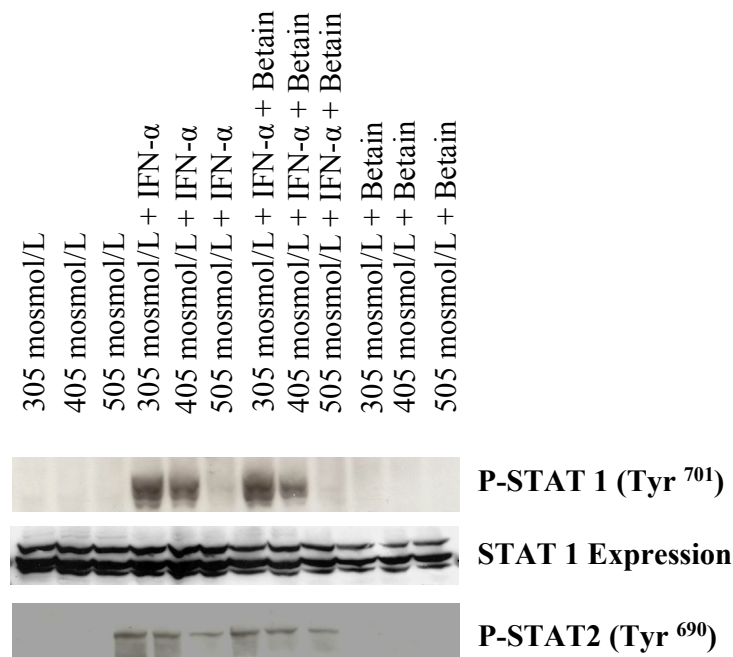


Abb. 3.21: Einfluss von hyperosmotischem Stress und Betain auf die IFN- α -induzierte STAT1 und STAT2 Phosphorylierung

HepG2 Zellen wurden nach einer Präinkubation mit 5 mM Betain für 12 h unter den angegebenen Osmolaritäten für 6 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 20 min mit IFN- α (1500 U/ml) stimuliert. Die Phosphorylierung von STAT1 und STAT2 wurde mittels Western-Blot und phosphospezifischer Antikörper mit Spezifität für phosphoryliertes STAT1 (Tyr⁷⁰¹) und phosphoryliertes STAT2 (Tyr⁶⁹⁰) visualisiert. Ebenfalls wurde die Expression von STAT1 detektiert.

In NTCP-transfzierten HepG2 Zellen inhibierte eine Vorinkubation für 6 h mit den pro-apoptotischen Gallensäuren GCDC oder TCDC (je 300µM) ebenfalls die IFN- α -induzierte Phosphorylierung von STAT1 (Tyr⁷⁰¹). Betain war auch hier nicht in der Lage, die Phosphorylierung von STAT1 wiederherzustellen (Abb. 3.22).

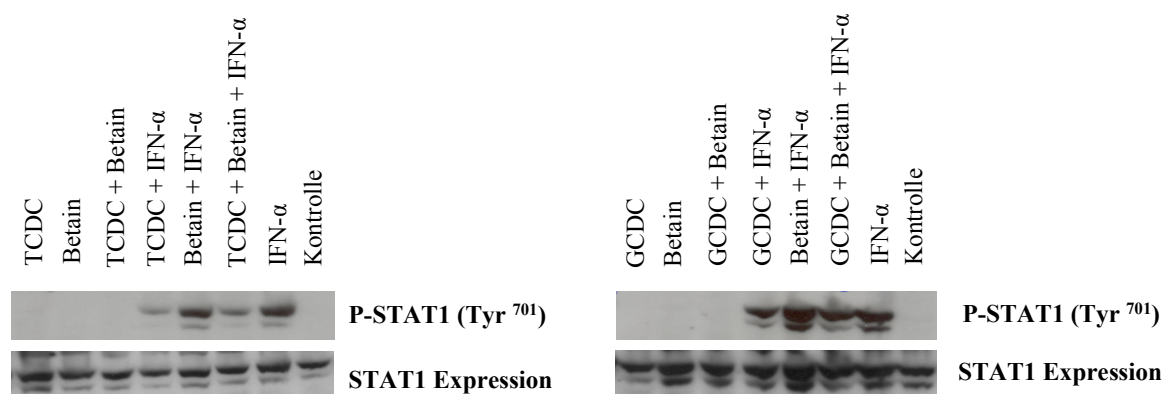


Abb. 3.22: Einfluss der Gallensäuren GCDC/ TCDC auf die IFN- α -induzierte STAT1-Phosphorylierung.

NTCP-HepG2 Zellen wurden für 12 h mit 5 mM Betain und anschließend weitere 6 h mit den pro-apoptotischen Gallensäuren TCDC (A) oder GCDC (B) (je 300µM) inkubiert. Wenn angegeben, wurden die Zellen für 20 min mit 1500 U/ml IFN- α stimuliert. 60 µg Protein vom Zelllysate wurden elektrophoretisch in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran gebロットet. Spezifische Antikörper gegen STAT1 oder phosphoryliertes STAT1 (Tyr⁷⁰¹) dienten der Detektion.

Um die Ursache für die inhibierte Transkription aufzudecken, wurde - wie für die Rezeptoruntereinheit gp130 des IL-6 Signalweges gezeigt (vgl. 3.1.3) - eine Spaltung des Rezeptors IFNAR1 oder IFNAR2 vermutet. Der IFNAR2 enthält in seiner Aminosäuresequenz wie gp130 potentielle Spaltmotive für die Caspase 3. Um für mögliche folgende mutagene Analysen zwischen dem Wildtyp und den mutierten Formen des Rezeptors IFNAR2 unterscheiden zu können, wurde das Konstrukt IFNAR2-HA verwendet. Dieser besteht aus dem kompletten Protein IFNAR2 und ist carboxyterminal an ein Hämagglutinin (HA)-tag fusioniert. Der Rezeptor konnte so mit spezifischen Antikörpern gegen das HA-tag detektiert werden. Das Konstrukt IFNAR2-HA wurde zunächst wegen der hohen Transfektionseffizienz in NIH-3T3 Zellen transfiziert und konnte im Western Blot sowie in der Immunzytochemie detektiert werden (Abb. 3.23). Staurosporin induziert in NIH-3T3 Zellen eine Apoptose [149]. Eine Stimulation dieser Zellen mit Staurosporin regulierte die Expression von IFNAR2-HA herab (Abb. 3.23 B). Folgend wurden Lysate der mit IFNAR2-HA transfzierten NIH-3T3 Zellen, wie unter 2.2.5 beschrieben, mit aktiver Caspase 3 inkubiert. Diese Inkubation führte ebenfalls zu einer Herabregulation des IFNAR2-HA (Abb. 3.23 C). In beiden Experimenten wurde kein Spaltprodukt detektiert. Bei näherer Sequenz-Analyse der 9 Aminosäuren des HA-tag zeigte sich auch hier ein potentielles

Spaltmotiv für die Caspase 3: YPY**DVPD**YA. Zeitgleich erschien in *Nature Methods* eine ausführliche Beschreibung über Caspase 3/7-abhängiges Cleavage des HA-tag [156].

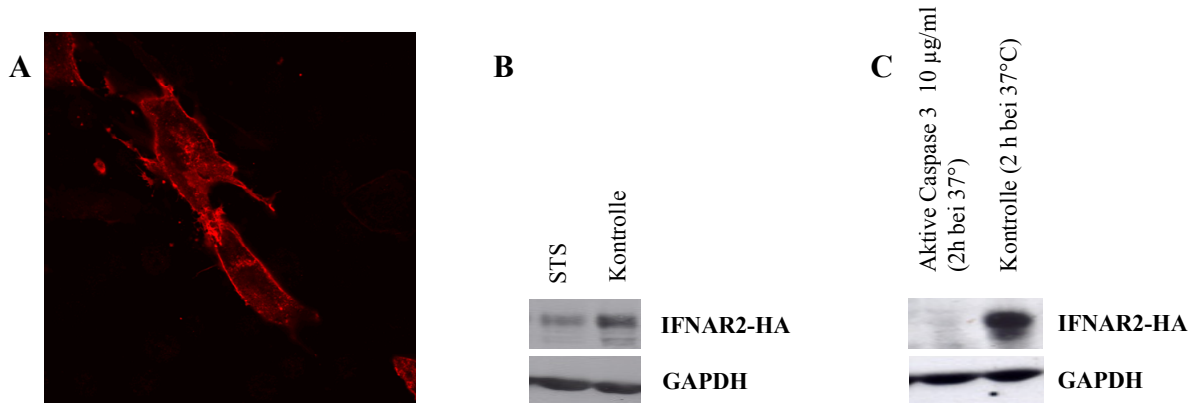


Abb. 3.23: Caspase 3-vermittelte Degradation von IFNAR2-HA

NIH-3T3 Zellen wurden mit dem Konstrukt IFNAR2-HA transfeziert und mit einem spezifischen Antikörper gegen das HA-tag und einem Cy3 gekoppeltem 2. Antikörper detektiert (A). Die Zellen wurden 6 h mit 1 µM Staurosporin (STS) inkubiert, 60 µg Protein vom Zelllysate elektrophoretisch in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran gebロットet. Spezifische Antikörper gegen das HA-tag oder GAPDH (als Beladungskontrolle) dienen der Detektion (B). Die transfezierten Zelllysate wurden mit rekombinanter aktiver Caspase 3 für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Abbruch der Reaktion wurden die Reaktionsansätze im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen das HA-tag detektiert. Die Expression von GAPDH diente als Beladungskontrolle (C).

Daraufhin wurde die Expression von IFNAR2 mit direkten Antikörpern gegen die Rezeptoren IFNAR1 und IFNAR2 analysiert. In Abb. 3.24 ist die Expression der Rezeptoren IFNAR1 und IFNAR2 im Western-Blot nach einer 26 h Inkubation mit der Gallensäure TCDC (300 µM) in NTCP-transfezierten HepG2 Zellen oder 405 mosmol/L in HepG2 Zellen gezeigt. Die Expression der Rezeptoruntereinheiten blieb unverändert.

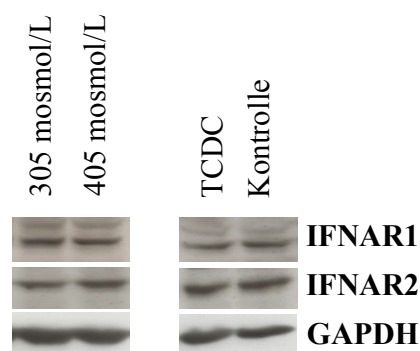


Abb. 3.24: Einfluss von hyperosmotischem Stress und TCDC auf die IFNAR1- und IFNAR2-Expression

(A) HepG2 Zellen wurden unter normoosmotischen (305 mosmol/L) oder hyperosmotischen (405 mosmol/L) Bedingungen für 24 h kultiviert. (B) NTCP-transfezierte HepG2 Zellen wurden unbehandelt gelassen (Kontrolle) oder für 26 h mit 300 µM TCDC inkubiert. 60 µg des Gesamt-Protein-Extraktes wurde im Western Blot auf die Expression der Rezeptoren IFNAR1 und IFNAR2 analysiert. GAPDH wurde als Beladungskontrolle detektiert.

4. Diskussion

Diese Dissertation befasst sich mit der Beeinflussung der hepatoprotektiv wirkenden Signalwege IL-6 und IFN- α durch pro-apoptotische Stimuli. Der erste Teil dieser Arbeit erörtert die Modulation des IL-6 Signalweges und der Abschnitt 4.2 geht näher auf den IFN- α Signalweg ein.

4.1 Caspase-abhängige Modulation des IL-6 Signalweges

Ziel dieser Arbeit war unter anderem, den molekularen Mechanismus für die Herabregulation von gp130 und die damit verbundene Hemmung der Phosphorylierung von STAT3 und SHP2 zu identifizieren. Wie verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien zeigten, ist die gp130-vermittelte Signaltransduktion als Antwort auf IL-6-Typ Zytokine für die Leberregeneration und hepatoprotektive Mechanismen von großer Bedeutung [5, 16-23]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von gp130 durch pro-apoptotische Stimuli wie hydrophobe Gallensäuren, CD95L und hyperosmotischen Stress herabreguliert wird. Diese Herabregulation der signalweiterleitenden Rezeptoruntereinheit korrelierte mit einer Hemmung der STAT3- und SHP2-Phosphorylierung in Anwesenheit von CD95L. Da die gp130-mRNA-Level unter CD95L- und GCDL-Stimulation unverändert blieben, wurde ein vermehrter Abbau des Rezeptors gp130 auf Proteinebene in Betracht gezogen. Es fiel auf, dass nur Caspase-induzierende Stimuli eine Herabregulation des IL-6 Signals vermitteln. Diese Annahme fand Bestätigung in der Beobachtung, dass die Inhibition der Caspasen 3 und 8 die Expression des Rezeptors gp130 und die IL-6-induzierte Phosphorylierung von STAT3 und SHP2 unter CD95L-Stimulation wiederherstellten. In einem *in vitro* Caspase-Assay wurde belegt, dass die Zugabe von rekombinanter, aktiver Caspase 3 zu Zelllysaten von primären Rattenhepatozyten zu einer kompletten Spaltung des Rezeptors gp130 führte. Nach einer Aminosäuresequenz-Analyse fand sich in der intrazytoplasmatischen Domäne des humanen gp130 Rezeptors zwischen den Aminosäuren 800-806 ein potentiellles Spaltmotiv der Caspase 3: DHVDGGD (vgl. Abb. 4.1). Die Aminosäure-Sequenz DXXD zählt zu den bevorzugten Spaltmotiven der Caspase 3, welches sich von dem typischen Spaltmotiv der Caspase 8 LETD unterscheidet [157-159]. Diese Tatsache spricht nicht gegen die Untersuchungen mit den Caspase 8-Inhibitoren, da die Inhibierung der Caspase 8 die CD95L-

vermittelte Aktivierung der Caspase 8 und die damit verbundene Aktivierung der Caspase 3 verhindert.

Mutagene Analysen sollten dieses potentielle Spaltmotiv der Caspase 3 näher charakterisieren. Der chimäre Rezeptor Epo/gp130 wurde nach dem Austausch der Aminosäure Aspartat durch Glutamat (AS 800-806: DHVDGGD zu AS 800-806: DHVEGGD und AS 800-806: DHVEGGE) im Gegensatz zur Wildtypform nicht durch die rekombinante aktive Caspase 3 degradiert, und das bei der Wildtypform detektierte Fragment von 18 kDa wurde nicht mehr nachgewiesen. Dies spricht dafür, dass die Caspase 3-vermittelte Spaltung des Rezeptors in dem Motiv AS 800-806: DHVDGGD stattfindet und zur Freisetzung eines Spaltproduktes von 18 kDa führt. Diese Fragmentgröße stimmt auch mit dem theoretisch abgeschätzten Molekulargewicht der 125 Aminosäuren des abgespaltenen C-Terminus überein (1 Aminosäure entspricht ca. 110 Da: $125 \times 110 \text{ Da} = 14 \text{ kDa}$). In den Zellkulturversuchen waren die beiden mutierten Formen von Epo/gp130 (AS 800-806: DHVEGGD und AS 800-806: DHVEGGE) größtenteils resistent gegenüber der Staurosporin- oder GCDC-induzierten Herabregulation, allerdings konnte die IL-6-vermittelte Phosphorylierung von STAT3 nicht wiederhergestellt werden.

Die Spaltung des Rezeptors gp130 an dem identifizierten Spaltmotiv DHVDGGD zwischen den Aminosäuren 800 und 806 der zytoplasmatischen Domäne von gp130 resultiert in der Freisetzung eines C-terminalen 18 kDa Spaltproduktes. Da dieses Fragment nur in dem *in vitro* Assay und nicht in den Zellkulturversuchen nachgewiesen werden konnte, wurde eine weiterführende Degradation dieses Fragmentes in der Zelle vermutet, die jedoch nicht näher untersucht wurde. Das Schicksal des größeren N-terminalen Fragmentes von gp130 blieb ebenfalls ungeklärt, da keine der verschiedenen verwendeten Antikörper für die Detektion der N-terminalen Domäne von gp130 oder des Epo-Rezeptors in der Immunzytochemie oder im Western Blot geeignet waren. Möglicherweise unterliegt die N-terminale Domäne von gp130 auch einer weiteren Degradation, die durch die Caspase-vermittelte Spaltung an dem hier identifizierten Spaltmotiv von gp130 zwischen den Positionen 800-806 initiiert werden könnte.

Sollte nach dem Cleavage der trunkierte, membranständige Rezeptor erhalten bleiben, würden drei der vier distalen Tyrosin-Motive fehlen, die für die Rekrutierung der STAT-Faktoren essentiell sind (Tyr⁷⁶⁷, Tyr⁸¹⁴, Tyr⁹⁰⁵, Tyr⁹¹⁵) [2, 3], welches die reduzierte STAT-Phosphorylierung in Gegenwart von CD95-Ligand- oder GCDC erklären würde. Die IL-6-induzierte Phosphorylierung der SHP2 ist ebenfalls durch CD95-Ligand inhibiert. SHP2 bindet gp130 an dem Tyr⁷⁵⁹ [32], welches nach der Spaltung an dem N-terminalen,

membranständigen Teil des Rezeptors verbleiben würde. Diese Tatsache legt nahe, dass die CD95-Ligand-vermittelte Caspase-abhängige Degradierung des gp130 Rezeptors in einem kompletten Funktionsverlust der Signalweiterleitung von gp130 resultiert. Dies könnte einerseits durch weitere inhibierende Mechanismen oder durch einen weiteren Protein-Abbau des Rezeptors gp130 zu erklären sein (vgl. oben). Die CD95-Ligand-vermittelte Hemmung der STAT3-Aktivierung scheint jedoch alleinig durch Caspasen vermittelt zu sein, da die Inhibition der gp130 Herabregulation durch Caspase-Inhibitoren die IL-6-vermittelte STAT3-Phosphorylierung (Tyr⁷⁰⁵) wiederherstellt [147]. Im Gegensatz dazu wurde bei den Caspase-Inhibitor-Studien unter Gallensäuren-Stimulation zwar die gp130 Expression wiederhergestellt jedoch nicht die Phosphorylierung von STAT3 (Tyr⁷⁰⁵) [1]. Demzufolge bestehen bei der Inhibition der IL-6-induzierten STAT3-Aktivierung durch Gallensäuren noch weitere Mechanismen. So wurde z.B. gezeigt, dass die Hemmung der p38^{MAPK} die GCDC-induzierte Unterdrückung der STAT3 (Tyr⁷⁰⁵) Phosphorylierung teilweise wieder aufhebt, ohne die gp130 Expression zu beeinflussen. Dies lässt eine Mitwirkung der p38^{MAPK} an der GCDC-induzierten Inhibition der STAT3-Aktivierung vermuten [1].

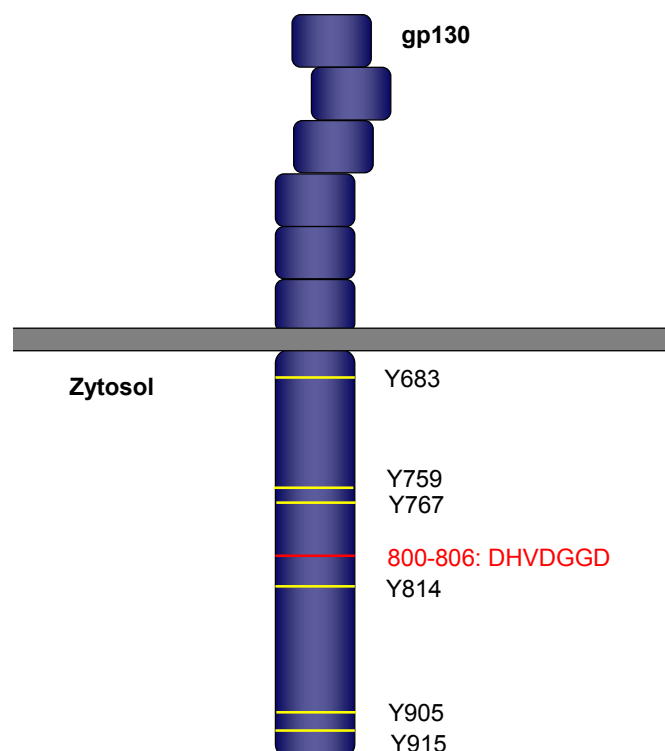


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Rezeptors gp130, des zytoplasmatisch gelegenen Spaltmotives und der entscheidenden Tyrosinreste für die Aktivierung der Jak/STAT-Signalkaskade. Nähere Erläuterungen im Text.

Für eine Reihe von Faktoren, wie TNF- α , LPS und IL-1 β ist belegt, dass sie die IL-6-vermittelte Aktivierung von STAT3 via Aktivierung der p38^{MAPK} unterdrücken [55, 56, 162]. Insbesondere für TNF- α und zum Teil auch für LPS wurde belegt, dass sie p38^{MAPK}-abhängig parallel zur Hemmung der STAT3-Aktivierung auch die Expression von SOCS3 induzieren. Da SOCS3 ein potenter Inhibitor der STAT3-Aktivierung ist, liegt hier eine funktionelle Verbindung nahe. Die hydrophobe Gallensäure GCDC wie auch CD95-Ligand führen jedoch zu keinem signifikantem Anstieg der SOCS3-mRNA-Expression in Hepatozyten [1, 147]. Dies schließt SOCS3 als Erklärung für die GCDC- oder CD95-Ligand-induzierte Hemmung der STAT3-Aktivierung aus.

Einige Plasma-Membran-Rezeptoren sind bekannte Substrate für Caspasen, wie z. B. die Rezeptoren für EGF, TNF- α oder einige Mitglieder sogenannter *dependence receptors* [66, 67, 142, 160, 161]. Wie die vorliegende Arbeit belegt, wird auch gp130 Caspase 3-abhängig gespalten. Der Rezeptor ist ein essentielles Signalelement für die Mitglieder der IL-6-Typ Zytokine, sodass die Caspase-abhängige Degradation von gp130 zu einer zellulären Resistenz gegenüber diesen Zytokinen führt. Essentielle Signalwege der Zellen werden so unabhängig von der eigentlichen Apoptose-Induktion gestört und vermitteln andere pathophysiologische Effekte. Ebenfalls muss man bedenken, dass eine CD95-vermittelte Caspase-Aktivierung auch ohne die Induktion der Apoptose stattfinden kann, wie z. B. für milden hyperosmotischen Stress gezeigt wurde [115].

IL-6 besitzt eine Vielfalt an biologischen Wirkungen und ist an der Modulation der Entzündung, der Immunregulation, der Hämatopoese und der Onkogenese beteiligt. In Hepatozyten induziert IL-6 die Synthese und Sekretion von Akut-Phase-Proteinen (APP) vom Typ2 und wirkt synergistisch mit IL-1 bei der Induktion von Typ1 APP (z.B. C-reaktives Protein, Serum Amyloid A und P, Komplementfaktoren, Koagulationsfaktoren, Proteaseinhibitoren, metallbindende Proteine u.a.). Studien mit IL-6-Knockout-Mäusen verdeutlichen die Bedeutung von IL-6 für die hepatische Homöostase im Rahmen der Inflammation. Sie zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber hepatotoxischen Reizen [16-18]. Es wurde z.B. beschrieben, dass sich IL-6-Knockout-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren, 12 Wochen nach einer Gallengangsligation in einem fortgeschrittenerem Stadium der biliären Fibrose befinden, welches mit höheren Serum-Bilirubin-Spiegeln sowie erhöhter Mortalität einhergeht [16]. Hingegen ist die Bedeutung von IL-6 für die Leberregeneration umstritten. Einerseits gilt IL-6 als positiver Auslöser der Hepatozyten-Proliferation und es wurde gezeigt, dass die Leberregeneration in IL-6-defizienten Tieren nach partieller Hepatektomie stark

vermindert ist [19]. Andererseits wurde gezeigt, dass IL-6 nach partieller Hepatektomie protektive Signalwege induziert, ohne die Hepatozyten-Proliferation signifikant zu beeinflussen. Eine Überstimulation führte sogar zur Inhibition der Hepatozyten-Proliferation [21].

Die Rolle der gp130-abhängigen Signalwege wurde in gp130 Knockout-Mäusen untersucht. Diese zeigten nach IL-6- oder OSM-Stimulation eine blockierte STAT3 Aktivierung und verminderte Akut-Phase-Gen-Expression. Nach der Stimulation mit LPS wiesen die Knockout-Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine verstärkte hepatozelluläre Apoptose, einen erhöhten TNF- α -Level im Serum und eine reduzierte NF-kappaB Aktivierung in Hepatozyten auf. Diese Daten sprechen dafür, dass gp130 essentiell an der Akut-Phase-Regulation beteiligt ist und die hepatozelluläre Protektion nach LPS-Stimulation fördert [22]. Nach einer Gallengangsligation (BDL) zeigten Wildtyp-Tiere erhöhte Level an IL-6, STAT3-Aktivierung und einen Anstieg des Akut-Phase-Proteins Serum-Amyloid-A (SAA), welche in den gp130 Knockout-Mäusen gehemmt waren [23]. Die Inhibition der gp130-abhängigen Signalwege resultierte nach der BDL in einer erhöhten bakteriellen Infektion, Leberschädigung und Mortalität. Während einer akuten oder chronischen Cholestase ist das gp130-System für die Kontrolle der Akut-Phase-Antwort essentiell. In gp130 Knockout-Mäusen ist ebenfalls der protektive Effekt des IL-6/gp130-abhängigen Signalweges nach einer partiellen Hepatektomie gezeigt worden [20]. Die Stimulation mit LPS führte in diesen Tieren, sowie in IL-6 Knockout-Tieren nach einer partiellen Hepatektomie zu einer erhöhten Mortalität und zu einer reduzierten DNA-Synthese sowie einer höheren Apoptose-Rate.

Es ist mehrfach gezeigt, dass STAT3 Signale übermittelt, die für die Proliferation und das Überleben von Zellen eine wichtige Rolle spielen können. STAT3 aktiviert unter anderem Gene, die in die Kontrolle des Zellzyklus involviert sind, wie Zyklin D1, D2 und D3, und die anti-apoptotisch wirken, wie c-myc, bcl-xl oder bcl [163].

Die Aktivierung der Caspase 3 im Rahmen einer Leberzellschädigung löst nicht nur pro-apoptotische Mechanismen aus, sondern könnte auch protektive Signalwege der Leber durch die Degradation von gp130 und die Hemmung der STAT3-/ SHP2-Phosphorylierung unterdrücken. Patienten mit cholestatischen Syndromen und einer Leberzirrhose haben häufig eine geringe Kapazität zur Leberregeneration. Erhöhte Gallensäuren-Konzentrationen sind möglicherweise dafür mitverantwortlich, indem sie den protektiven IL-6 Signalweg und so die Leberregeneration und die Akut-Phase-Antwort inhibieren.

Hepatozyten sind verschiedenen pro-apoptotischen Stimuli ausgesetzt. Die CD95L-induzierte Apoptose in Hepatozyten [158, 159, 164-166] spielt hierbei eine bedeutende Rolle. Patienten mit einer NASH (*non-alcoholic steato-hepatitis*) zeigen eine erhöhte Expression von CD95: das Ausmaß der Apoptose in Hepatozyten korreliert hier mit dem Schweregrad der Erkrankung. Gleichmaßen zeigen Lebergewebe von HCV-infizierten Patienten oder von Patienten mit chronischem Alkoholkonsum eine verstärkte CD95-Expression und eine CD95L-induzierte Apoptose. Ebenfalls wurde hier eine erhöhte Caspase-Aktivität gefunden [165, 166]. Es liegt somit nahe, dass die Caspase-Aktivierung die IL-6-induzierten hepatoprotektiven Effekte über einen vermehrten Abbau von gp130 modulieren und eine Hepatotoxizität triggern könnte.

4.2 Einfluss von pro-apoptotischen Stimuli und Betain auf die antivirale Antwort

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Beeinflussung des IFN- α Signalweges durch pro-apoptotische Stimuli. IFN sind pleiotrope Zytokine, die antiviral, immunmodulatorisch und antiproliferativ wirken. Sie werden im Rahmen einer chronischen HCV-Infektion als Standardtherapie in Kombination mit Ribavirin eingesetzt. Da Patienten mit erhöhten Gallensäurensiegeln schlechter auf die IFN- α / Ribavirin-Kombinationstherapie ansprechen, ist es von großer Bedeutung, die Frage zu klären, ob Gallensäuren oder hyperosmotischer Stress, der bereits unter einer milden Hybernatriämie im klinischen Alltag auftritt, eine IFN- α Resistenz bedingen.

Diese Arbeit belegt, dass pro-apoptotische Gallensäuren und Hyperosmolarität eine IFN- α Resistenz auf der Ebene der STAT1 (Tyr⁷⁰¹)/ STAT2 (Tyr⁶⁹⁰) Phosphorylierung bedingen und so die Induktion der antiviralen Proteine MxA und PKR hemmen. Die Herabregulation der MxA-Expression unter hyperosmotischen Bedingungen erfolgte auf Ebene der mRNA. Da die Phosphorylierung von STAT1/2 durch hyperosmotischen Stress unterdrückt war, wurde der Abfall der MxA-mRNA auf eine supprimierte Transkription zurückgeführt und nicht auf eine Destabilisierung der mRNA, wie es für die BHMT unter hyperosmotischen Bedingungen gezeigt ist [167]. Hyperosmotischer Stress und pro-apoptotische Gallensäuren induzieren in Hepatozyten, vermittelt durch die NADPH Oxidase, eine rasche Produktion von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) [94, 131]. Die Reduktion an zellulärem ROS durch den Einsatz von diversen Antioxidantien oder Inhibition der NADPH Oxidase (vgl. Tabelle 3.1) konnte die MxA-Expression in Gegenwart von hyperosmotischem Stress nicht wiederherstellen. Auch die Hemmung des Lysosoms mit Bafilomycin A, welches die lysosomale Degradation blockiert, war ebenfalls nicht suffizient, um die MxA-Expression wiederherzustellen. Der Inhibitor der proteasomalen Degradation MG132 zeigte ebenfalls keinen Effekt (vgl. Tabelle 3.1).

Wie im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben, führte die durch Gallensäuren- oder CD95L-induzierte Apoptose zu einer Caspase-vermittelten Spaltung der IL-6-signalvermittelnden Rezeptoruntereinheit gp130. Jedoch ist die durch Gallensäuren oder Hyperosmolarität induzierte Reduktion der IFN- α -induzierten MxA-Expression und STAT1/2 Phosphorylierung nicht auf eine verminderte Expression der Rezeptoruntereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 zurückzuführen. Zudem hatten Caspase-Inhibitoren keinen Einfluss auf die

MxA-Expression. Die Jak/STAT-Signaltransduktion wird durch verschiedene Proteine wie z.B. SOCS1/3, SHP2, PIAS oder verschiedene Phosphatasen wie die MAPK Phosphatase-1 (MKP-1) und die T-Zellen Protein Tyrosin Phosphatase (TC-PTP) gehemmt (vgl. Einleitung unter 1.5). Experimente legen nahe, dass hyperosmotisch-induzierter Stress und Gallensäuren eine Aktivierung oder Expression von verschiedenen Phosphatasen wie MKP-1 [168] und SHP2 [169] induzieren, welche unter verschiedenen experimentellen Bedingungen zu einer Inhibition der STAT1 Aktivierung führen können [170, 171]. Im Rahmen unserer experimentellen Bedingungen hatten verschiedene Serin-/Threonin-Phosphatase-Inhibitoren in Gegenwart von hyperosmotischem Stress jedoch keinen Einfluss auf die MxA-Expression.

Die Frage, ob Gallensäuren, die während einer Lebererkrankung akkumulieren, oder eine moderate Hyperosmolarität, wie sie unter einer milden Hybernatriämie gefunden wird, eine IFN- α Resistenz begünstigen, ist von großer klinischer Bedeutung. Die Kombinations-Therapie bestehend aus IFN- α und Ribavirin wird als Standard-Therapie bei HCV-Infektionen angewendet. Es ist bekannt, dass HCV-Proteine die IFN-Antwort modulieren, indem sie die Expression, Aktivierung oder nukleäre Translokation und DNA-Anbindung von STAT1 und/oder des ISGF3 Komplexes stören. Des Weiteren interferieren HCV-Proteine direkt mit der Aktivität der antiviralen Proteine PKR und OAS. Es wurde gezeigt, dass auch verschiedene Patienten-abhängige Faktoren die Erfolgsrate dieser Therapie beeinflussen: so korreliert die Erfolgsrate der IFN-Therapie negativ mit den Gallensäurensiegeln im Serum [172, 173] und Patienten mit einer fortgeschrittenen Leberzirrhose sprechen schlechter auf diese Therapie an [174]. Da diese Patienten erhöhte Gallensäurensiegel im Serum aufweisen, erscheint eine Modulation der IFN-Antwort durch Gallensäuren prinzipiell möglich. Für Gallensäuren wurde gezeigt, dass sie die IFN-induzierte Expression von antiviralen Proteinen in Leberzellen [175], natürlichen Killerzellen [176] und Lymphozyten [177] hemmen und die Hepatitis C Virus Replikation und HBV DNA-Synthese steigern [178, 179]. Der nukleäre Gallensäuren-Rezeptor *farnesoid x receptor* (FXR) scheint dabei für die vermehrte Replikation von HCV/HBV durch Gallensäuren eine Rolle zu spielen, wobei der molekulare Mechanismen noch ungeklärt ist. In unseren Experimenten hatte jedoch der FXR Agonist GW4064 keinen modulierenden Effekt auf die IFN- α -induzierte MxA-Expression.

Betain ist ein Trimethylglyzin mit einem positiv geladenen Ammonium und drei Methyl-Gruppen und vermittelt über verschiedene Mechanismen diverse hepatoprotektive Effekte [121, 122, 127, 180]. Es ist ein bekanntes Osmolyt, agiert als Methylgruppen-Donor oder als Chaperon und besitzt Protein-stabilisierende Eigenschaften [122, 180]. In dieser

Arbeit stellte Betain die IFN- α -induzierte MxA-Protein-Expression in Gegenwart der Gallensäuren GCDC/ TCDC oder im Rahmen von hyperosmotischem Stress wieder her.

Für Betain und S-Adenosylmethionin (SAM), ein Produkt des Methionin-Metabolismus und einem wichtigen Methylgruppen-Donor, wurde gezeigt, dass sie die HCV induzierte Unterdrückung des IFN- α Signals *in vitro* wiederherstellen [181]. Dabei wurde eine Methylierung von STAT1 in Gegenwart von Betain oder SAM identifiziert, welche eine verstärkte transkriptionelle Aktivität vermittelte. In der vorliegenden Arbeit hatte SAM jedoch keinen Effekt auf die durch Hyperosmolarität vermittelte Inhibition der IFN- α -induzierten MxA-Expression.

Der Einfluss von Betain führte jedoch nicht zu einer Wiederherstellung der IFN- α -induzierten Phosphorylierung von STAT1/2. Da Betain auch die herabregulierte MxA-mRNA unter hyperosmotischen Bedingungen nicht steigern konnte, ist ein posttranslationeller Wirkmechanismus für Betain anzunehmen. Da Betain als Chaperon wirken kann, wäre eine stabilisierende Wirkung von Betain auf das Protein MxA, wie es für die *bovine ribonuclease A* (RNase A) [182] oder das *myosin subfragment-1* [183] gezeigt wurde, denkbar. Andererseits wurde dargelegt, dass Osmolyte die Sekundär- und Tertiär-Struktur der RNA *in vitro* beeinflussen [184]. Betain könnte daher auch die tRNA stabilisieren, wie es für trimethylamin N-oxid [185] oder die Stabilität der humanen Telomerase RNA U177 pseudoknot und die p2b Haarnadelstruktur gezeigt wurde, und dadurch die Translation des MxA-Proteins steigern, um so die reduzierte MxA-mRNA zu kompensieren. Um den molekularen Wirkmechanismus von Betain aufklären zu können, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Die Standard-Therapie von IFN- α und Ribavirin mit Betain zu ergänzen, könnte möglicherweise die Erfolgsrate der Therapie bei chronisch HCV infizierten Patienten steigern, zudem belegen klinische Studien bei NASH-Patienten keine signifikanten Nebenwirkungen für eine Betain-Therapie [186, 187].

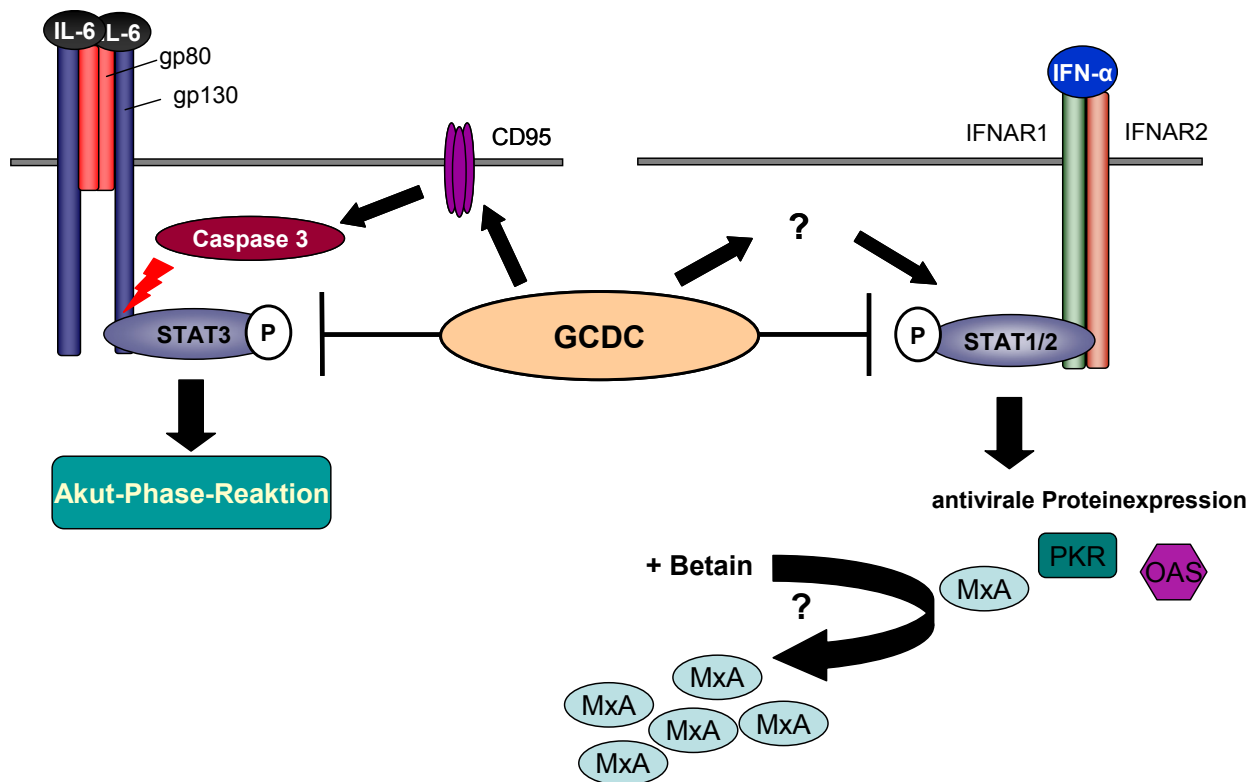


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der inhibierenden Wirkung von pro-apoptotischen Stimuli (beispielhaft für GCDC) auf die Signaltransduktionswege von IL-6 und IFN- α .

5. Zusammenfassung

Die IL-6 und IFN- α Signalwege stellen Schlüsselemente der Immunabwehr dar und gelten als wichtige protektive Mechanismen der Leber. Bei vielen Lebererkrankungen sind IL-6 oder IFN- α stimulierte Zellen einer Reihe pro-apoptotischer Stimuli ausgesetzt, wie z.B. erhöhten Gallensäurenspiegel, hyperosmotischem Stress oder CD95-Ligand, wobei es zu einem Crosstalk der verschiedenen Signalelemente kommen kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Modulation der IL-6 und IFN- α Signalwege durch pro-apoptotische Stimuli untersucht.

Die Stimulation von Hepatozyten mit pro-apoptotischen Gallensäuren oder dem CD95-Ligand induziert eine Aktivierung der Caspasen-Kaskade und führt zu einer Inhibierung der IL-6 Signaltransduktion. Diese Arbeit belegt die Caspase 3-vermittelte Spaltung des IL-6 signalweiterleitenden Rezeptors gp130, sodass die IL-6 Signaltransduktion auf Ebene der STAT3 (Tyr⁷⁵⁹) und SHP2 (Tyr⁵⁸⁰) Phosphorylierung inhibiert wird. Durch eingefügte Punktmutationen in der Aminosäure-Sequenz 800-806: DHVDGGD des Rezeptors Epo/gp130 wurde das Spaltmotiv der Rezeptoruntereinheit gp130 identifiziert und die Expression unter pro-apoptotischen Gallensäuren wiederhergestellt.

Weiterhin belegt diese Arbeit die Inhibierung des IFN- α Signalweges durch pro-apoptotische Gallensäuren und hyperosmotischen Stress, indem sie eine Inhibition der STAT1 (Tyr⁷⁰¹)/ STAT2 (Tyr⁶⁹⁰) Phosphorylierung vermitteln und eine verminderte Expression der antiviralen Proteine MxA und PKR unter IFN- α Stimulation bewirken. Dies könnte der molekulare Mechanismus für die Beobachtung sein, dass Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion und erhöhten Gallensäurenspiegel schlechter auf die Kombinationstherapie bestehend aus IFN- α und Ribavirin ansprechen. Die als Osmolyt, Chaperon oder Methylgruppen-Donor agierende Trimethylamin-Verbindung Betain stellte die Expression von MxA wieder her, wobei eine Modulation der STAT1/2-Phosphorylierung oder der MxA-mRNA nicht erzielt wurde.

Diese Arbeit belegt, dass pro-apoptotische Einflüsse wie der CD95-Ligand, hyperosmotischer Stress und hydrophobe Gallensäuren die hepatoprotektiv wirkenden Signalwege von IL-6 sowie IFN- α auf verschiedenen Ebenen inhibieren und so neben der Apoptose-Induktion eine hepatozelluläre Schädigung vermitteln können.

6. Summary

IL-6 and IFN- α are pleiotropic cytokines, which are involved in the modulation of acute phase reaction, immune defense and mediate hepatoprotective effects in response to hepatotoxins. In patients with chronic liver diseases, IL-6 and IFN- α stimulated cells are exposed to different proapoptotic stimuli like bile acids, hyperosmotic stress or CD95-ligand so that a crosstalk of the different signalling elements seems possible. This study analysis the modulation of IL-6 and IFN- α signalling pathways by proapoptotic stimuli.

Incubation of hepatocytes with proapoptotic bile acids or CD95-ligand lead to activation of caspases and downregulation of gp130 expression, thereby inhibiting IL-6 induced STAT3 (Tyr⁷⁵⁹) and SHP2 (Tyr⁵⁸⁰) phosphorylation. This study characterizes the caspase 3 mediated cleavage of the human IL-6 signal-transducing subunit gp130 and identifies the caspase 3 cleavage site within position 800-806 (DHVDGGD) of its aminoacid sequence. Introduction of point mutations into this motif by exchanging the aspartate residue against glutamate restored the expression of the receptor in presence of proapoptotic bile acids but did not modulate the IL-6 induced phosphorylation of STAT3 (Tyr⁷⁵⁹) and SHP2 (Tyr⁵⁸⁰).

Furthermore this study shows that proapoptotic bile acids or hyperosmotic stress inhibit IFN- α signalling by blocking STAT1 (Tyr⁷⁰¹)/ STAT2 (Tyr⁶⁹⁰) phosphorylation, thereby reducing expression of the IFN- α induced antiviral proteins MxA and PKR. This could be the molecular mechanism for the observation that patients with a chronic HCV infection and increased bile acid concentrations response less well to the IFN- α / ribavirin combination therapy. Betaine is a well known osmolyte that acts as a chaperone or methyl group donor, which restores expression of MxA. However, neither phosphorylation of STAT1/2 nor reduced MxA-mRNA expression was affected by betaine so that a posttranscriptional mechanism seems likely.

This study shows that proapoptotic conditions like CD95-ligand, hyperosmotic stress or hydrophobic bile acids not only trigger proapoptotic pathways but also induce hepatotoxicity by antagonizing the hepatoprotective signalling pathways of IL-6 and IFN- α .

7. Literaturverzeichnis

1. 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* 2006 Nov;44(5):1206-1217.
2. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998 Sep 1;334 (Pt 2):297-314.
3. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003 Aug 15;374(Pt 1):1-20.
4. Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med* 1998 Jan 15;128(2):127-137.
5. Streetz KL, Tacke F, Leifeld L, Wustefeld T, Graw A, Klein C, et al. Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases. *Hepatology* 2003 Jul;38(1):218-229.
6. Barton BE. The biological effects of interleukin 6. *Med Res Rev* 1996 Jan;16(1):87-109.
7. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997 Mar;6(3):315-325.
8. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 1997;15:797-819.
9. Gatsios P, Haubeck HD, Van de LE, Frisch W, Apte SS, Greiling H, et al. Oncostatin M differentially regulates tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-3 gene expression in human synovial lining cells. *Eur J Biochem* 1996 Oct 1;241(1):56-63.
10. Oh JW, Van Wagoner NJ, Rose-John S, Benveniste EN. Role of IL-6 and the soluble IL-6 receptor in inhibition of VCAM-1 gene expression. *J Immunol* 1998 Nov 1;161(9):4992-4999.
11. Aderka D, Le JM, Vilcek J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *J Immunol* 1989 Dec 1;143(11):3517-3523.
12. Aderka D, Maor Y, Novick D, Engelmann H, Kahn Y, Levo Y, et al. Interleukin-6 inhibits the proliferation of B-chronic lymphocytic leukemia cells that is induced by tumor necrosis factor-alpha or -beta. *Blood* 1993 Apr 15;81(8):2076-2084.

13. La Flamme AC, MacDonald AS, Pearce EJ. Role of IL-6 in directing the initial immune response to schistosome eggs. *J Immunol* 2000 Mar 1;164(5):2419-2426.
14. Kimura F, Miyazaki M, Suwa T, Sugiura T, Shinoda T, Itoh H, et al. Serum interleukin-6 levels in patients with biliary obstruction. *Hepatogastroenterology* 1999 May;46(27):1613-1617.
15. Padillo FJ, Andicoberry B, Muntane J, Lozano JM, Mino G, Sitges-Serra A, et al. Cytokines and acute-phase response markers derangements in patients with obstructive jaundice. *Hepatogastroenterology* 2001 Mar;48(38):378-381.
16. Ezure T, Sakamoto T, Tsuji H, Lunz JG, III, Murase N, Fung JJ, et al. The development and compensation of biliary cirrhosis in interleukin-6-deficient mice. *Am J Pathol* 2000 May;156(5):1627-1639.
17. Sewnath ME, van der PT, 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* 2004 Feb 1;169(3):413-420.
18. Kovalovich K, DeAngelis RA, Li W, Furth EE, Ciliberto G, Taub R. Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. *Hepatology* 2000 Jan;31(1):149-159.
19. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996 Nov 22;274(5291):1379-1383.
20. Wuestefeld T, Klein C, Streetz KL, Betz U, Lauber J, Buer J, et al. Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. *J Biol Chem* 2003 Mar 28;278(13):11281-11288.
21. Blindenbacher A, Wang X, Langer I, Savino R, Terracciano L, Heim MH. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 2003 Sep;38(3):674-682.
22. Streetz KL, Wustefeld T, Klein C, Kallen KJ, Tronche F, Betz UA, et al. Lack of gp130 expression in hepatocytes promotes liver injury. *Gastroenterology* 2003 Aug;125(2):532-543.
23. Wuestefeld T, Klein C, Streetz KL, Beraza N, Scholmerich J, Burgart LJ, et al. Lack of gp130 expression results in more bacterial infection and higher mortality during chronic cholestasis in mice. *Hepatology* 2005 Nov;42(5):1082-1090.
24. Rose-John S, Waetzig GH, Scheller J, Grotzinger J, Seegert D. The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 2007 May;11(5):613-624.
25. 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* 2006 Aug;80(2):227-236.

26. Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Hemmann U, Landgraf C, Schneider-Mergener J, et al. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem* 1996 May 31;271(22):12991-12998.
27. Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE, Jr., Yancopoulos GD. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 1995 Mar 3;267(5202):1349-1353.
28. Häussinger D, Kubitz R, Reinehr R, Bode JG, Schliess F. Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology. *Mol Aspects Med* 2004 Jun;25(3):221-360.
29. Symes A, Stahl N, Reeves SA, Farruggella T, Servidei T, Gearan T, et al. The protein tyrosine phosphatase SHP-2 negatively regulates ciliary neurotrophic factor induction of gene expression. *Curr Biol* 1997 Sep 1;7(9):697-700.
30. Schaper F, Gendo C, Eck M, Schmitz J, Grimm C, Anhuf D, et al. Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem J* 1998 Nov 1;335 (Pt 3):557-565.
31. Kim H, Hawley TS, Hawley RG, Baumann H. Protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2) moderates signaling by gp130 but is not required for the induction of acute-phase plasma protein genes in hepatic cells. *Mol Cell Biol* 1998 Mar;18(3):1525-1533.
32. Lehmann U, Schmitz J, Weissenbach M, Sobota RM, Hortner M, Friederichs K, et al. SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *J Biol Chem* 2003 Jan 3;278(1):661-671.
33. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997 Jun 26;387(6636):917-921.
34. Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 1997 Jun 26;387(6636):924-929.
35. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001 Oct;14(4):778-809, table.
36. Takaoka A, Yanai H. Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* 2006 Jun;8(6):907-922.
37. van Boxel-Dezaire AH, Rani MR, Stark GR. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity* 2006 Sep;25(3):361-372.
38. Foster GR. Interferons in host defense. *Semin Liver Dis* 1997;17(4):287-295.

39. Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Dec 22;95(26):15623-15628.
40. Haller O, Kochs G. Interferon-induced Mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* 2002 Oct;3(10):710-717.
41. Garcia MA, Meurs EF, Esteban M. The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* 2007 Jun;89(6-7):799-811.
42. Hovanessian AG, Justesen J. The human 2'-5'oligoadenylate synthetase family: unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation. *Biochimie* 2007 Jun;89(6-7):779-788.
43. Landolfo S, Gribaudo G, Angeretti A, Gariglio M. Mechanisms of viral inhibition by interferons. *Pharmacol Ther* 1995 Mar;65(3):415-442.
44. Haller O, Stertz S, Kochs G. The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. *Microbes Infect* 2007 Nov;9(14-15):1636-1643.
45. Heinrich PC, Bode J, Decker M, Graeve L, Martens A, Muller-Newen G, et al. Termination and modulation of IL-6-type cytokine signaling. *Adv Exp Med Biol* 2001;495:153-160.
46. Wormald S, Hilton DJ. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* 2004 Jan 9;279(2):821-824.
47. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci* 2000 Aug;113 (Pt 16):2813-2819.
48. Hilton DJ. Negative regulators of cytokine signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 1999 Sep;55(12):1568-1577.
49. 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* 1997 Jun 26;387(6636):921-924.
50. 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 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Oct 27;95(22):13130-13134.
51. Auernhammer CJ, Bousquet C, Melmed S. Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Jun 8;96(12):6964-6969.
52. Haspel RL, Darnell JE, Jr. A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Aug 31;96(18):10188-10193.
53. Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, et al. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 1997 Dec 5;278(5344):1803-1805.

54. 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* 2002 Oct;18(4):374-379.
55. Bode JG, Nimmesgern A, Schmitz J, Schaper F, Schmitt M, Frisch W, et al. LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages. *FEBS Lett* 1999 Dec 17;463(3):365-370.
56. Bode JG, Schweigart J, Kehrmann J, Ehrling C, Schaper F, Heinrich PC, et al. TNF-alpha induces tyrosine phosphorylation and recruitment of the Src homology protein-tyrosine phosphatase 2 to the gp130 signal-transducing subunit of the IL-6 receptor complex. *J Immunol* 2003 Jul 1;171(1):257-266.
57. 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* 1999 Aug 20;457(1):162-168.
58. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 Aug;26(4):239-257.
59. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998 Feb 15;101(4):890-898.
60. Levin S, Bucci TJ, Cohen SM, Fix AS, Hardisty JF, LeGrand EK, et al. The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol Pathol* 1999 Jul;27(4):484-490.
61. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995 Jan;146(1):3-15.
62. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000 Oct 12;407(6805):784-788.
63. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003 Dec;15(6):725-731.
64. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene* 2003 Nov 24;22(53):8543-8567.
65. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005 Oct;115(10):2665-2672.
66. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2003 Jan;10(1):76-100.
67. Graf D, Bode JG, Häussinger D. Caspases and receptor cleavage. *Arch Biochem Biophys* 2007 Jun 15;462(2):162-170.

68. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000 Oct 12;407(6805):770-776.
69. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 2002 Aug;7(4):313-319.
70. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999 Apr;11(2):255-260.
71. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001 Feb 23;104(4):487-501.
72. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999;17:331-367.
73. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998 Mar 16;17(6):1675-1687.
74. Faubion WA, Gores GJ. Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology* 1999 Jan;29(1):1-4.
75. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998 Aug 28;281(5381):1309-1312.
76. Bao Q, Shi Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* 2007 Jan;14(1):56-65.
77. Schafer ZT, Kornbluth S. The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Dev Cell* 2006 May;10(5):549-561.
78. Hirschfield GM, Heathcote EJ. Cholestasis and cholestatic syndromes. *Curr Opin Gastroenterol* 2009 May;25(3):175-179.
79. Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, et al. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* 1999 Jan;103(1):137-145.
80. Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology* 1999 Sep;117(3):669-677.
81. Sodeman T, Bronk SF, Roberts PJ, Miyoshi H, Gores GJ. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000 Jun;278(6):G992-G999.
82. Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 2008 May;134(6):1641-1654.
83. Paumgartner G, Beuers U. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* 2002 Sep;36(3):525-531.

84. Borgstrom B. Bile salts--their physiological functions in the gastrointestinal tract. *Acta Med Scand* 1974 Jul;196(1-2):1-10.
85. Houten SM, Watanabe M, Auwerx J. Endocrine functions of bile acids. *EMBO J* 2006 Apr 5;25(7):1419-1425.
86. Keitel V, Kubitz R, Häussinger D. Endocrine and paracrine role of bile acids. *World J Gastroenterol* 2008 Oct 7;14(37):5620-5629.
87. Schliess F, Kurz AK, vom DS, Häussinger D. Mitogen-activated protein kinases mediate the stimulation of bile acid secretion by tauroursodeoxycholate in rat liver. *Gastroenterology* 1997 Oct;113(4):1306-1314.
88. Kurz AK, Graf D, Schmitt M, vom DS, Häussinger D. Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats. *Gastroenterology* 2001 Aug;121(2):407-419.
89. Häussinger D, Kurz AK, Wettstein M, Graf D, vom DS, Schliess F. Involvement of integrins and Src in tauroursodeoxycholate-induced and swelling-induced choleresis. *Gastroenterology* 2003 May;124(5):1476-1487.
90. Graf D, Kurz AK, Fischer R, Reinehr R, Häussinger D. Taurolithocholic acid-3 sulfate induces CD95 trafficking and apoptosis in a c-Jun N-terminal kinase-dependent manner. *Gastroenterology* 2002 May;122(5):1411-1427.
91. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 1999 May 21;284(5418):1362-1365.
92. Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 1999 May 21;284(5418):1365-1368.
93. Kullak-Ublick GA, Meier PJ. Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis* 2000 May;4(2):357-385.
94. Reinehr R, Becker S, Keitel V, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation. *Gastroenterology* 2005 Dec;129(6):2009-2031.
95. Reinehr R, Becker S, Wettstein M, Häussinger D. Involvement of the Src family kinase yes in bile salt-induced apoptosis. *Gastroenterology* 2004 Nov;127(5):1540-1557.
96. Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprecht E, Sokol RJ. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2001 Mar;33(3):616-626.
97. Schmucker DL, Ohta M, Kanai S, Sato Y, Kitani K. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. *Hepatology* 1990 Nov;12(5):1216-1221.

98. Patel T, Roberts LR, Jones BA, Gores GJ. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. *Semin Liver Dis* 1998;18(2):105-114.
99. Yoon JH, Gores GJ. Death receptor-mediated apoptosis and the liver. *J Hepatol* 2002 Sep;37(3):400-410.
100. Rodrigues CM, Steer CJ. Bile acids and hepatocyte apoptosis: living/leaving life in the Fas lane. *Gastroenterology* 1999 Sep;117(3):732-736.
101. Reinehr R, Graf D, Häussinger D. Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation. *Gastroenterology* 2003 Sep;125(3):839-853.
102. Reinehr R, Häussinger D. CD95 activation in the liver: ion fluxes and oxidative signaling. *Arch Biochem Biophys* 2007 Jun 15;462(2):124-131.
103. Higuchi H, Gores GJ. Bile acid regulation of hepatic physiology: IV. Bile acids and death receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003 May;284(5):G734-G738.
104. 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* 1998 Mar;4(3):165-178.
105. 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* 1999 Sep;6(9):842-854.
106. Kultz D. Cellular osmoregulation: beyond ion transport and cell volume. *Zoology (Jena)* 2001;104(3-4):198-208.
107. Schliess F, Häussinger D. The cellular hydration state: a critical determinant for cell death and survival. *Biol Chem* 2002 Mar;383(3-4):577-583.
108. Schliess F, Häussinger D. Cell volume and insulin signaling. *Int Rev Cytol* 2003;225:187-228.
109. Häussinger D, Schliess F, Warskulat U, vom DS. Liver cell hydration. *Cell Biol Toxicol* 1997 Jul;13(4-5):275-287.
110. Häussinger D, Lang F. Cell volume in the regulation of hepatic function: a mechanism for metabolic control. *Biochim Biophys Acta* 1991 Dec 12;1071(4):331-350.
111. Häussinger D, Lang F. Cell volume and hormone action. *Trends Pharmacol Sci* 1992 Oct;13(10):371-373.
112. Häussinger D, Lang F, Gerok W. Regulation of cell function by the cellular hydration state. *Am J Physiol* 1994 Sep;267(3 Pt 1):E343-E355.

113. Häussinger D. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem J* 1996 Feb 1;313 (Pt 3):697-710.
114. Graf J, Häussinger D. Ion transport in hepatocytes: mechanisms and correlations to cell volume, hormone actions and metabolism. *J Hepatol* 1996;24 Suppl 1:53-77.
115. Reinehr R, Graf D, Fischer R, Schliess F, Häussinger D. Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. *Hepatology* 2002 Sep;36(3):602-614.
116. Reinehr R, Schliess F, Häussinger D. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. *FASEB J* 2003 Apr;17(6):731-733.
117. Schliess F, Häussinger D. Cell hydration and insulin signalling. *Cell Physiol Biochem* 2000;10(5-6):403-408.
118. Miyakawa H, Woo SK, Chen CP, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Cis- and trans-acting factors regulating transcription of the BGT1 gene in response to hypertonicity. *Am J Physiol* 1998 Apr;274(4 Pt 2):F753-F761.
119. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 1982 Sep 24;217(4566):1214-1222.
120. Schliess F, Wiese S, Häussinger D. Osmotic regulation of the heat shock response in H4IIE rat hepatoma cells. *FASEB J* 1999 Sep;13(12):1557-1564.
121. Wettstein M, Häussinger D. Cytoprotection by the osmolytes betaine and taurine in ischemia-reoxygenation injury in the perfused rat liver. *Hepatology* 1997 Dec;26(6):1560-1566.
122. Liu Y, Bolen DW. The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Biochemistry* 1995 Oct 3;34(39):12884-12891.
123. Chen X, Sebastian BM, Tang H, McMullen MM, Axhemi A, Jacobsen DW, et al. Taurine supplementation prevents ethanol-induced decrease in serum adiponectin and reduces hepatic steatosis in rats. *Hepatology* 2008 Dec 30.
124. Wettstein M, Häussinger D. Taurine attenuates cold ischemia-reoxygenation injury in rat liver. *Transplantation* 2000 Jun 15;69(11):2290-2296.
125. Zhang F, Tong L, Qiao H, Dong X, Qiao G, Jiang H, et al. Taurine attenuates multiple organ injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rats. *J Surg Res* 2008 Sep;149(1):101-109.
126. Zhang F, Mao Y, Qiao H, Jiang H, Zhao H, Chen X, et al. Protective effects of taurine against endotoxin-induced acute liver injury after hepatic ischemia reperfusion. *Amino Acids* 2009 Mar 5.

127. Graf D, Kurz AK, Reinehr R, Fischer R, Kircheis G, Häussinger D. Prevention of bile acid-induced apoptosis by betaine in rat liver. *Hepatology* 2002 Oct;36(4 Pt 1):829-839.
128. Ji C, Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 2003 May;124(5):1488-1499.
129. Häussinger D, Laubenberger J, vom Dahl S, Ernst T, Bayer S, Langer M, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 1994 Nov;107(5):1475-1480.
130. Lee JH, Arcinue E, Ross BD. Brief report: organic osmolytes in the brain of an infant with hyponatremia. *N Engl J Med* 1994 Aug 18;331(7):439-442.
131. Reinehr R, Becker S, Braun J, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. Endosomal acidification and activation of NADPH oxidase isoforms are upstream events in hyperosmolarity-induced hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem* 2006 Aug 11;281(32):23150-23166.
132. Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem* 2000 Apr 28;275(17):12848-12856.
133. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996 Oct;6(10):986-994.
134. Lang R, Heeg K. Semiquantitative determination of human cytokine mRNA expression using TaqMan RT-PCR. *Inflammopharmacology* 1998;6(4):297-309.
135. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 2001 Dec;25(4):402-408.
136. 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* 1978;52:48-59.
137. vom DS, 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* 1997 Mar;35(3):221-226.
138. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968;97:77-89.
139. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 May 7;72:248-254.

140. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug 15;227(5259):680-685.
141. Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to Nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984 Dec;10(3-4):203-209.
142. Bae SS, Choi JH, Oh YS, Perry DK, Ryu SH, Suh PG. Proteolytic cleavage of epidermal growth factor receptor by caspases. *FEBS Lett* 2001 Feb 23;491(1-2):16-20.
143. Albrecht U, Yang X, Asselta R, Keitel V, Tenchini ML, Ludwig S, et al. Activation of NF-kappaB by IL-1beta blocks IL-6-induced sustained STAT3 activation and STAT3-dependent gene expression of the human gamma-fibrinogen gene. *Cell Signal* 2007 Sep;19(9):1866-1878.
144. Duan HO, Simpson-Haidaris PJ. Cell type-specific differential induction of the human gamma-fibrinogen promoter by interleukin-6. *J Biol Chem* 2006 May 5;281(18):12451-12457.
145. Fuller GM, Zhang Z. Transcriptional control mechanism of fibrinogen gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:469-479.
146. Araki T, Nawa H, Neel BG. Tyrosyl phosphorylation of Shp2 is required for normal ERK activation in response to some, but not all, growth factors. *J Biol Chem* 2003 Oct 24;278(43):41677-41684.
147. Graf D, Haselow K, Munks I, Bode JG, Häussinger D. Caspase-mediated cleavage of the signal-transducing IL-6 receptor subunit gp130. *Arch Biochem Biophys* 2008 Sep 15;477(2):330-338.
148. Suzuki A, Tsutomi Y, Yamamoto N, Shibutani T, Akahane K. Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death. *Mol Cell Biol* 1999 May;19(5):3842-3847.
149. Tang D, Okada H, Ruland J, Liu L, Stambolic V, Mak TW, et al. Akt is activated in response to an apoptotic signal. *J Biol Chem* 2001 Aug 10;276(32):30461-30466.
150. Fiorucci G, Percario ZA, Marcolin C, Coccia EM, Affabris E, Romeo G. Inhibition of protein phosphorylation modulates expression of the Jak family protein tyrosine kinases. *J Virol* 1995 Sep;69(9):5833-5837.
151. Barak AJ, Beckenhauer HC, Tuma DJ. Betaine, ethanol, and the liver: a review. *Alcohol* 1996 Jul;13(4):395-398.
152. Mato JM, Lu SC. Role of S-adenosyl-L-methionine in liver health and injury. *Hepatology* 2007 May;45(5):1306-1312.
153. Pajares MA, Perez-Sala D. Betaine homocysteine S-methyltransferase: just a regulator of homocysteine metabolism? *Cell Mol Life Sci* 2006 Dec;63(23):2792-2803.

154. Wijekoon EP, Brosnan ME, Brosnan JT. Homocysteine metabolism in diabetes. *Biochem Soc Trans* 2007 Nov;35(Pt 5):1175-1179.
155. Wilken DR, McMacken ML, Rodriguez A. Choline and betaine aldehyde oxidation by rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1970 Sep 1;216(2):305-317.
156. Schembri L, Dalibart R, Tomasello F, Legembre P, Ichas F, De GF. The HA tag is cleaved and loses immunoreactivity during apoptosis. *Nat Methods* 2007 Feb;4(2):107-108.
157. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999;68:383-424.
158. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 2005 Jul;54(7):1024-1033.
159. Schattenberg JM, Galle PR, Schuchmann M. Apoptosis in liver disease. *Liver Int* 2006 Oct;26(8):904-911.
160. Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S. Receptors that mediate cellular dependence. *Cell Death Differ* 2005 Aug;12(8):1031-1043.
161. Mehlen P, Bredesen DE. The dependence receptor hypothesis. *Apoptosis* 2004 Jan;9(1):37-49.
162. Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 2000 May 15;19(21):2548-2556.
163. Quintanilla-Martinez L, Kremer M, Specht K, Calzada-Wack J, Nathrath M, Schaich R, et al. Analysis of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat 3) pathway in multiple myeloma: Stat 3 activation and cyclin D1 dysregulation are mutually exclusive events. *Am J Pathol* 2003 May;162(5):1449-1461.
164. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003 Aug;125(2):437-443.
165. Pianko S, Patella S, Ostapowicz G, Desmond P, Sievert W. Fas-mediated hepatocyte apoptosis is increased by hepatitis C virus infection and alcohol consumption, and may be associated with hepatic fibrosis: mechanisms of liver cell injury in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2001 Nov;8(6):406-413.
166. Bantel H, Luger A, Poremba C, Luger N, Held J, Domschke W, et al. Caspase activation correlates with the degree of inflammatory liver injury in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001 Oct;34(4 Pt 1):758-767.

167. Schäfer C, Hoffmann L, Heldt K, Lornejad-Schäfer MR, Brauers G, Gehrmann T, Garrow TA, Häussinger D, Mayatepek E, Schwahn BC, Schliess F. Osmotic regulation of betaine homocysteine-S-methyltransferase expression in H4IIE rat hepatoma cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol* 2007;292:1089-1098.
168. Lornejad-Schäfer M, Schäfer C, Richter L, Grune T, Häussinger D, Schliess F. Osmotic regulation of MG-132-induced MAP-kinase phosphatase MKP-1 expression in H4IIE rat hepatoma cells. *Cell Physiol Biochem* 2005;16(4-6):193-206.
169. Khare S, Holgren C, Samarel AM. Deoxycholic acid differentially regulates focal adhesion kinase phosphorylation: role of tyrosine phosphatase ShP2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006 Dec;291(6):G1100-G1112.
170. Hong F, Nguyen VA, Gao B. Tumor necrosis factor alpha attenuates interferon alpha signaling in the liver: involvement of SOCS3 and SHP2 and implication in resistance to interferon therapy. *FASEB J* 2001 Jul;15(9):1595-1597.
171. Liu D, Scafidi J, Prada AE, Zahedi K, Davis AE, III. Nuclear phosphatases and the proteasome in suppression of STAT1 activity in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Dec 13;299(4):574-580.
172. Jorquera F, Monte MJ, Guerra J, Sanchez-Campos S, Merayo JA, Olcoz JL, et al. Usefulness of combined measurement of serum bile acids and ferritin as additional prognostic markers to predict failure to reach sustained response to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2005 Apr;20(4):547-554.
173. Serfaty L, Giral P, Loria A, Andreani T, Legendre C, Poupon R. Factors predictive of the response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1994 Jul;21(1):12-17.
174. Zeuzem S. Heterogeneous virologic response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well? *Ann Intern Med* 2004 Mar 2;140(5):370-381.
175. Podevin P, Rosmorduc O, Conti F, Calmus Y, Meier PJ, Poupon R. Bile acids modulate the interferon signalling pathway. *Hepatology* 1999 Jun;29(6):1840-1847.
176. Podevin P, Calmus Y, Bonnefis MT, Veyrunes C, Chereau C, Poupon R. Effect of cholestasis and bile acids on interferon-induced 2',5'-adenylate synthetase and NK cell activities. *Gastroenterology* 1995 Apr;108(4):1192-1198.
177. Podevin P, Blanc MC, Vaubourdolle M, Veyrunes C, Bonnefis MT, Poupon R. Bile acid inhibition of interferon activity in human lymphocytes: no evidence of oxidative stress. *Eur J Clin Invest* 1997 Jun;27(6):491-496.
178. Ramiere C, Scholtes C, Diaz O, Icard V, Perrin-Cocon L, Traubaud MA, et al. Transactivation of the hepatitis B virus core promoter by the nuclear receptor FXRalpha. *J Virol* 2008 Nov;82(21):10832-10840.

179. Scholtes C, Diaz O, Icard V, Kaul A, Bartenschlager R, Lotteau V, et al. Enhancement of genotype 1 hepatitis C virus replication by bile acids through FXR. *J Hepatol* 2008 Feb;48(2):192-199.
180. Ji C, Shinohara M, Kuhlenkamp J, Chan C, Kaplowitz N. Mechanisms of protection by the betaine-homocysteine methyltransferase/betaine system in HepG2 cells and primary mouse hepatocytes. *Hepatology* 2007 Nov;46(5):1586-1596.
181. Duong FH, Christen V, Filipowicz M, Heim MH. S-Adenosylmethionine and betaine correct hepatitis C virus induced inhibition of interferon signaling in vitro. *Hepatology* 2006 Apr;43(4):796-806.
182. Knapp S, Ladenstein R, Galinski EA. Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles* 1999 Aug;3(3):191-198.
183. Ortiz-Costa S, Sorenson MM, Sola-Penna M. Betaine protects urea-induced denaturation of myosin subfragment-1. *FEBS J* 2008 Jul;275(13):3388-3396.
184. Lambert D, Draper DE. Effects of osmolytes on RNA secondary and tertiary structure stabilities and RNA-Mg²⁺ interactions. *J Mol Biol* 2007 Jul 27;370(5):993-1005.
185. Gluick TC, Yadav S. Trimethylamine N-oxide stabilizes RNA tertiary structure and attenuates the denaturing effects of urea. *J Am Chem Soc* 2003 Apr 16;125(15):4418-4419.
186. Angulo P, Lindor KD. Treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002 Oct;16(5):797-810.
187. Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem* 2007 Mar;18(3):184-195.

8. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α_2 M	α_2 -Makroglobulin
Apaf	Apoptose-Protease aktivierender Faktor
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BDL	Gallengangsligatur
Bid	<i>Bcl-2-interacting protein</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsep	<i>bile salt export pump</i>
cAMP	Adenosin-3', 5'-monophosphat
Caspase	Cystein-abhängige Aspartat-schneidende Protease
CD95L	CD95-Ligand
CD95	CD95-Rezeptor
cDNA	<i>copy DNA</i>
C/EBP	<i>CCAAT enhancer binding protein</i>
CIS	<i>cytokine inducible SH2 protein</i>
CLC	<i>cardiotrophin-like cytokine</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CREB	CRE-bindendes Protein
CT-1	<i>cardiotrophin-1</i>
DCC	<i>deleted in colorectal cancer</i>
DD	<i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DISC	<i>death-inducing signalling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGCG	Epigallocatechin Gallat

EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
Epo	Erythropoetin
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FADD	<i>fas associated death domain</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FLIP	FLICE (Caspase 8)-inhibitorisches Protein
g, kg, mg, µg, ng	Gramm, Kilo-, Milli-, Mikro-, Nanogramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCDC	Glycochenodeoxycholsäure
gp130	Glykoprotein 130
gp80	Glykoprotein 80
Grb-SOS	<i>growth factor receptor bound protein/ Son of Sevenless</i>
h, min, sek	Stunde, Minute, Sekunde
HBV, HCV	Hepatitis-B-Virus, Hepatitis-C-Virus
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon Alpha Rezeptor 1
IL-6	Interleukin-6
JAB	<i>Jak-binding protein</i>
Jak	Janus-Kinase
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	Kilodalton
KIR	<i>kinase inhibitory region</i>
L, ml, µl	Liter, Milli-, Mikroliter
LIF	<i>leukemia inhibiting factor</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M, mM, µM, nM, pM	Molar, Milli-, Mikro-, Nano-, Picomolar
mA	Milliampere

MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase/Erk-Kinase</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MEM	<i>minimal essential medium</i>
MKP	MAPK-Phosphatase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MxA	<i>Myxovirus resistance protein A</i>
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NNT-1/BCF3	<i>novel neurotrophin-1/B cell stimulating factor-3</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NRTK	Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase
NTC	<i>non-template-control</i>
NTCP	<i>Na⁺/taurocholate cotransporting protein</i>
OSM	<i>oncostatin M</i>
P38 ^{MAPK}	p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly (ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PIAS	<i>protein inhibitors of activated STAT</i>
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKR	<i>dsRNA activated protein kinase</i>
RET	<i>rearranged during transfection</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>

RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
SEM	<i>standard error of mean</i>
SH	<i>Src-homology</i>
SHP2	<i>SH2-domain-containing tyrosine phosphatase</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
SSI	<i>STAT-inducible STAT inhibitor</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TBST	<i>Tris-buffered saline tween</i>
TC	Taurocholsäure
TCDC	Taurochenodeoxycholsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TLCS	Taurolithocholsäure-3-sulfat
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	<i>TNF-R associated death domain</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAMP	<i>TNF-receptor-related apoptosis protein</i>
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TUDC	Tauroursodeoxycholsäure
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
V	Volt
w/v	<i>weight per volume</i>

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Katrin Haselow
Geburtsdatum	08.10.1979
Geburtsort	Emsdetten
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

09/1986 bis 06/1990	Barbara-Grundschule, Ibbenbüren
08/1990 bis 06/1996	Anne-Frank-Realschule, Ibbenbüren
08/1996 bis 06/1999	Johannes-Kepler-Gymnasium, Ibbenbüren

Studium

10/1999 bis 05/2005	Studium der Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
07/2004 bis 05/2005	Diplomarbeit „Charakterisierung und Lokalisation hochaffiner Sonic Hedgehog (SHH)-Heparansulfat-Interaktionen in der Maus und ihre Bedeutung als Modulator der SHH-Signaltransduktion“

Promotion

ab 12/2005 bis 6/2009	Promotionsarbeit am Universitätsklinikum Düsseldorf in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie mit dem Thema: „Modulation der hepatischen Akut-Phase-Reaktion und der antiviralen Antwort durch pro-apoptotische Stimuli“
-----------------------	---

10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger für die Überlassung des interessanten Themas, die beständige Bereitschaft zur Diskussion, die anregenden Ideen sowie für die Möglichkeit, in seinem Institut arbeiten zu dürfen, bedanken.

Bei Herrn PD Dr. Johannes G. Bode bedanke ich mich für die engagierte Betreuung, kritische Begutachtung und stete Diskussionsbereitschaft. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dirk Graf für die wertvolle Betreuung, die zahlreichen Diskussionen und die freundliche Unterstützung während der gesamten Dissertation.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, mit denen ich zusammengearbeitet habe, möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, Unterstützung und freundliche Atmosphäre im Labor bedanken, insbesondere bei Frau Verena Marcus, Frau Annette Tries, Frau Caroline Kohlmann und Herrn Ivo Münks.

Herzlichst möchte ich mich auch bei meinen Freunden bedanken, ganz besonders bei meinem Freund René Bäumer, die mir in jeder Lebenslage unterstützend zur Seite standen. Der größte Dank gilt jedoch meiner gesamten Familie, vor allem meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht hatten und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

11. Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben. Alle Stellen, die aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den