

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

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger

Modulation des IFN- α - und IL-6-Signalweges in der Leber
durch proapoptotische Stimuli

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Ivo Paul Münks

2009

I

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

gez.: Universitätsprofessor Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Universitätsprofessor D. med. Hartmut Hengel

Korreferent: Universitätsprofessor Helmut L. Haas

Meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Apoptose	1
1.1.1	Allgemeines der Apoptose	1
1.1.2	Todesrezeptor-abhängige Apoptose und -unabhängige Apoptose	3
1.1.3	Gallensäuren-vermittelte Apoptose	5
1.2	Gallensäuren	7
1.2.1	Physiologische Relevanz von Gallensäuren	7
1.2.2	Gallensäuren-abhängige Signaltransduktion	8
1.3	Hyperosmolarität	10
1.3.1	Zellhydratation	10
1.3.2	Hyperosmotisch-bedingte Signaltransduktion und deren Bedeutung für die hepatozelluläre Apoptose	11
1.4	Interleukin-6: Signaltransduktion und physiologische Bedeutung	14
1.5	Typ I-Interferone: Signaltransduktion und physiologische Relevanz von IFN- α	18

2 Fragestellung

3 Materialien und Methoden

3.1	Isolation von primären Rattenhepatozyten und Zellkultur	21
3.2	Proteinbestimmung	22
3.3	Westernblot	22
3.4	Real Time PCR	23
3.5	Statistik	24
3.6	Materialien	24

4 Ergebnisse

4.1	Einfluss von CD95L und Hyperosmolarität auf den IL-6-Signalweg	28
4.1.1	Einfluss des CD95L und Hyperosmolarität auf die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung und gp130-Expression	28
4.1.2	Rolle des Proteasoms bzw. Lysosoms für die CD95L-induzierte gp130-Degradation	31
4.1.3	Rolle der Caspasen bei der CD95L-induzierten gp130-Degradation	34
4.2	Inhibition des IFN- α -Signalweges durch Hyperosmolarität	36
4.2.1	Modulation der IFN- α -induzierten STAT1-Phosphorylierung durch Hyperosmolarität und Gallensäuren	36
4.2.2	Inhibition der IFN- α -induzierten MxA-Expression durch Hyperosmolarität	38

5 Diskussion

5.1	Modulation des IL-6-Signalweges durch den CD95 Liganden und Hyperosmolarität	40
5.2	Modulation des IFN- α -Signalweges durch Gallensäuren und Hyperosmolarität	45

6	Zusammenfassung	47
----------	------------------------	-----------

Literatur, Anhang

Abkürzungen

α 2M	α 2-Makroglobulin
Apaf-1	Apoptose-Protease aktivierender Faktor
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bid	“Bcl-2-interacting protein”
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsep	“bile salt export pump”
cAMP	Adenosin-3', 5'-monophosphat
Caspase	Cystein-abhängige Aspartat-schneidende Protease
CD95L	CD95 Ligand
C/EBP	“CCAAT enhancer binding protein“
DISC	“death-inducing signalling complex”
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	“enhanced chemoluminescence”
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	“epidermal growth factor”
EGFP	“enhanced green fluorescent protein”
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
Erk	“extracellular signal-regulated kinase”
FADD	“fas associated death domain”
FAK	“focal adhesion kinase“
FCS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCDC	Glykochenodeoxycholsäure
gp130	Glykoprotein 130
Grb-SOS	“growth factor receptor bound protein/Son of Sevenless”
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IFN- α	Interferon- α
IL-6	Interleukin-6
IRF	“Interferon regulatory factor”
ISGF-3	“Interferon stimulated gene factor 3”
ISRE	“Interferon stimulated response element”

Jak	Janus-Kinase
JNK	“c-Jun N-terminal kinase”
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	“mitogen-activated protein kinase“
MEM	“minimal essential medium“
mRNA	“messenger RNA“
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NTC	“non-template-control”
NTCP	“Na ⁺ /taurocholate cotransporting protein”
OAS	“2'-5' oligoadenylate synthetase“
PARP	Poly (ADP-Ribose)-Polymerase
PIAS	“protein inhibitors of activated STATs”
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA, B, C	Proteinkinase A, B, C
RET	“rearranged during transfection“
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkriptase
SH	“Src-homolgy”
SHP2	“SH2-domain-containing tyrosine phosphatase”
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOCS	“suppressor of cytokine signalling”
STAT	“signal transducer and activator of transcription”
TBST	“Tris-buffered saline tween”
TC	Taurocholsäure
TCDC	Taurochenodeoxycholsäure
TIMP1	“tissue inhibitor of metalloproteinase”
TLCS	Taurolitocholsäure-3-sulfat
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	“TNF-R associated death domain”
TRAIL	“TNF-related apoptosis-inducing ligand”
TRAMP	“TNF-receptor-related apoptosis protein”
TUDC	Tauroursodeoxycholsäure
Tyk	Tyrosinkinase

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

Poster

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

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

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

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

Gp130, the signal-transducing IL-6-receptor subunit, is a substrate of caspases.

58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, Massachusetts, USA, 02.-06.11.2007

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

Interferon- α (IFN- α) Resistenz durch Gallensäuren und hyperosmotischen Stress.

Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber in Heidelberg, Deutschland, 30.-31.01.2009

Veröffentlichungen

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 477: 1000-1016, 2008

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

Modulation of IFN- α -signalling by hyperosmolarity and hydrophobic bile acids.

- in Vorbereitung -

1. Einleitung

1.1 Apoptose

1.1.1 Allgemeines der Apoptose

Der Zelltod ist essentiell für die normale Entwicklung und Differenzierung von Geweben, zur Aufrechterhaltung einer Zellhomöostase (Zelltod als Gegenpol zur Zellteilung) und als zelluläre Antwort auf schädigende Reize von außen oder auf körpereigene, funktionsbeeinträchtigende Veränderungen. Die Art und Weise, auf die eine Zelle stirbt, hängt von Art, Stärke und Dauer des einwirkenden Reizes, vom Zelltyp sowie dem Funktionszustand und den Umgebungsbedingungen der Zelle ab.

Nach morphologischen Kriterien werden zwei klassische Arten des Zelltodes, Nekrose und Apoptose, unterschieden (siehe Tabelle 1).

Die Nekrose zeichnet sich dadurch aus, dass die Zellmembran aufgrund eines Energiemangels und versagender Ionenpumpen oder aufgrund einer Membranschädigung in ihrer Integrität verändert wird. Konsekutiv strömen Wasser und Ionen ein, wodurch die Zelle und ihre Organellen schwellen und ihre Plasmamembranen lysieren. Durch Nekrose gehen meist größere Zellgruppen oder ganze Zellverbände zugrunde. Die freigesetzten Zytoplasmabestandteile lösen eine Entzündungsreaktion im umgebenden Gewebe aus (49;65;68;108).

Charakteristisch für die Apoptose, die durch Kerr et al. (50) erstmalig beschrieben und definiert wurde, ist ein genetisch determinierter und geordneter Ablauf in einzelnen Zellen oder kleinen Zellgruppen. Im Verlauf kommt es zu einer Abnahme des Zellvolumens, zur Fragmentierung der DNA und zu einer kernperipheren Chromatinkondensation, zum Abbau des Zytoskeletts sowie zur Bildung von Membranausstülpungen und schließlich zur Ausbildung von Apoptose-Körperchen. Letztere sind Membranvesikel, die DNA-Fragmente und Reste von Zellorganellen enthalten. Die Zellmembran bleibt hier im Gegensatz zur Nekrose intakt. Die Apoptose-Körperchen werden durch Makrophagen oder Nachbarzellen erkannt, phagozytiert und abgebaut, bevor ihre Membran lysiert. Dadurch wird eine Entzündungsreaktion vermieden (24;65;68;88). Es handelt sich im Gegensatz zur Nekrose um einen ATP (Adenosin-5'-triphosphat)-abhängigen Prozess.

Der intrazelluläre ATP-Gehalt ist mitbestimmend, ob eine Zelle durch Nekrose oder Apoptose stirbt. Höhere ATP-Konzentrationen begünstigen eine Apoptose, niedrigere ATP-Spiegel führen eher zu einer Nekrose.

Nekrose	Apoptose
Zellverbände / große Zellgruppen	einzelne Zellen / kleine Zellgruppen
Passiver Zelltod, Mangel an Nähr- oder Sauerstoff	Aktive Selbstzerstörung, genetisch determiniert
Mangel an ATP in der Zelle	Intrazellulärer Signalweg (Caspasen) / ATP-abhängig
defekte Zellmembran	Zerlegung der Zelle in Vesikel, Apoptosekörperchen
Zellschwellung / Schwellung der Zellorganellen	Abnahme des Zellvolumens
Lyse der Zelle	Phagozytose der Apoptose-Körperchen durch Makrophagen
Entzündungsreaktion	keine Entzündungsreaktion

Tabelle 1: Unterschiede des nekrotischen und apoptotischen Zelltodes

Für die Apoptoseauslösung wurden auf molekularer Ebene zwei Hauptmechanismen beschrieben, die Todesrezeptor-abhängige Apoptose sowie die Todesrezeptor-unabhängige Apoptose (1.1.2); sie führen beide zur Aktivierung von sogenannten Caspasen (Cystein-abhängige Aspartat-schneidende Proteasen) (19;108).

Caspasen liegen als Zymogene (inaktive Vorstufen) in allen kerntragenden Zellen vor und es sind 11 Mitglieder der Caspase-Familie im Menschen durch Sequenz- und Funktionshomologie bekannt (60). Sie sind eine der wenigen Proteasen, die in der lebenden Zelle nicht auf Kompartimente beschränkt sind, sondern frei im Zytoplasma vorkommen (21;63). Die Mitglieder dieser Enzymfamilie repräsentieren Cystein-Proteasen, die ein vier Aminosäuren beinhaltendes Motiv ihres entsprechenden Substrates erkennen, nämlich P4-P3-P2-P1. In der Regel finden sich die Caspase-Schnittstellen nach dem C-terminalen Rest (P1), der für gewöhnlich ein Aspartat ist.

Strukturell werden sie als Pro-Caspasen intrazellulär synthetisiert und erst nach Abspaltung der Prodomäne kann ein aktives Heterotetramer aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten gebildet werden. Die Abspaltung der Prodomäne kann durch gegenseitige Spaltung nach Bildung eines Dimers aus zwei Pro-Caspasen erfolgen. Dadurch aktivierte

Caspasen können sowohl sich selbst als auch andere Caspasen spalten (sog. Cleavage) und bilden so einen sich positiv verstärkenden Mechanismus (63).

Caspasen sind entscheidend beteiligt bei der Induktion und Ausführung des apoptotischen Zelltodes, eines der Schlüsselmerkmale ist die Spaltung von Proteinen, die für das Fortbestehen der zellulären Homöostase essentiell sind.

Caspase-abhängiges Cleavage konnte für verschiedene Gruppen von Molekülen gezeigt werden, z.B. für Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, STAT1 („signal transducer and activator of transcription“), CREB [CRE-bindendes Protein]), Zellzyklus-regulatorische Proteine (Cyklone, Retinoblastom-Protein) und an der Signaltransduktion beteiligte Kinasen (PKB, PKC, MEK); weiterhin können Proteine, die am Aufbau von zytoplasmatischen (Aktin, Vimentin) oder nukleären Proteinen involviert sind, sowie Proteine zur Reparatur und -Synthese von DNA (PARP [Poly (ADP-Ribose)-Polymerase], Topoisomerasen) durch Caspasen gespalten werden (21;27;31).

Die Aktivierung von Caspasen führt nicht notwendigerweise zur Induktion der Apoptose (2;82), sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei anderen zellulären Prozessen wie der Regulation des Zellzyklus und der Differenzierung (96).

Die Bedeutung von Caspasen für die Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion zeigt sich bei den Mitgliedern der sogenannten „dependence receptor“-Gruppe (z.B. DCC [“deleted in colorectal cancer“], RET [“rearranged during transfection“], MET, p75^{NTR}) (16;69). Sie umfasst eine Gruppe funktionell zusammengehöriger Rezeptoren, die in Anwesenheit ihrer Liganden mitogene, proliferative und anti-apoptotische Signale vermitteln, die das Überleben der Zelle sicherstellen. Hingegen werden sie in Abwesenheit der Liganden zu pro-apoptotischen Faktoren, da dann über Caspasen-vermittelte Spaltung der Rezeptoren an bestimmten Schnittstellen pro-apoptotische Rezeptorfragmente oder bisher maskierte Todes-Domänen entstehen, die den Zelltod vermitteln. Auch andere Plasmamembranrezeptoren wie z.B. EGF-R oder gp130 konnten als Substrate für eine Caspase-abhängige Spaltung identifiziert werden (5;31;32).

1.1.2 Todesrezeptor-abhängige und -unabhängige Apoptose

Apoptose kann durch die Bindung zugehöriger Liganden an sog. Todesrezeptoren in der Zellmembran ausgelöst werden, die zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNF-R) gehören. Zur Zeit sind folgende fünf Todesrezeptoren bekannt: Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor 1, CD95 (Fas/APO-1)-Rezeptor, der “TNF-receptor-related apoptosis protein“

(TRAMP)-Rezeptor und die "TNF-related apoptosis-inducing ligand" (TRAIL)-Rezeptoren 1 und 2. An die spezifischen Rezeptoren binden die dazugehörigen Liganden TNF α , CD95L, TRAMP und TRAIL.

Interaktion mit dem Liganden führt zur Polymerisierung mit gleichartigen Rezeptormolekülen und zur Bindung des Adaptermoleküls "fas associated death domain" (FADD) bzw. "TNF-R associated death domain" (TRADD) an den intrazytoplasmatischen Anteil des Rezeptors, der sog. Todesdomäne. An das FADD/TRADD werden wiederum mehrere Pro-Caspase 8 und/oder 10 Moleküle angelagert. Die gesamte Formation aus Todesrezeptoren, Adaptermolekülen und Pro-Caspasen 8 bzw. 10 wird als DISC ("death-inducing signalling complex") bezeichnet. Die enge Zusammenlagerung der Pro-Caspasen innerhalb des DISC ermöglicht ihre Dimerisierung und damit Aktivierung (10;19;55).

Bei sogenannten Typ I-Zellen führen die aktivierten Initiatorcaspasen 8 und 10 direkt zur Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7. Bei Typ II-Zellen benötigt das Rezeptor-induzierte Apoptosesignal eine Amplifikation über den mitochondrialen Signaltransduktionsweg (89). In diesem Fall führt die Caspase 8 zur proteolytischen Spaltung des sog. "Bcl-2-interacting protein" (Bid) in tBid, welches daraufhin zum Mitochondrium transloziert und eine Cytochrom C-Freisetzung bedingt (siehe Abbildung 1 unter 1.1.3).

Der mitochondriale, Todesrezeptor-unabhängige Apoptoseweg wird hauptsächlich durch direkte Einwirkung von zytotoxischen Substanzen wie Chemikalien und Zytostatika auf die Mitochondrien und durch DNA-Schäden infolge Bestrahlung oder durch Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 vermittelt. Eine Erhöhung der mitochondrialen Membranpermeabilität erfolgt weiterhin durch proapoptotische Proteine wie Bax und Bak oder erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel, NO (Stickstoffmonoxid) und ROS (Reaktive Sauerstoffspezies).

Der entscheidende Schritt im mitochondrialen Apoptoseweg ist die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytoplasma aufgrund einer erhöhten Membranpermeabilität, wo es an den Apaf-1 (Apoptose-Protease aktivierender Faktor) und ATP bindet. Dieser Proteinkomplex lagert sich mit Monomeren der Pro-Caspase 9 zusammen. Es entsteht ein Komplex, der als Apoptosom bezeichnet wird. In seinem Milieu dimerisieren die Pro-Caspase 9-Monomere zu aktiven Caspase 9-Molekülen (10;19).

Der Todesrezeptor-unabhängige Apoptoseweg mündet wie der Todesrezeptor-abhängige Weg in der Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7, die durch die Initiatorcaspasen proteolytisch aktiviert werden (Abbildung 1).

1.1.3 Gallensäuren-vermittelte Apoptose

TLCS und GCDC induzieren die Aktivierung der Caspasen 3, 8 und 9 und eine Apoptose in Hepatozyten (25;33-35;82;83). Bei der Gallensäuren-induzierten Apoptose spielt die CD95-Rezeptoraktivierung, die Liganden-unabhängig geschieht, eine wichtige Rolle.

Die Aktivierung des Rezeptors geschieht in Gegenwart der Gallensäuren über eine Translokation des CD95 zur Plasmamembran, an der eine hohe Rezeptordichte zur Oligomerisierung und Aktivierung der Rezeptoren führt (25;33;80;81). Der weitere Ablauf folgt dem Muster der Liganden-abhängigen Apoptose in Typ II-Zellen (1.1.2). Auch resultiert die erhöhte Dichte der Rezeptoren an der Membran in einer Sensibilisierung der Zellen für den CD95 Liganden-induzierten Zelltod (25;84).

Die Translokation des CD95 involviert mehrere Zwischenschritte (80;84). Nach Stimulation mit hydrophoben Gallensäuren kommt es zur Aktivierung einer sauren Sphingomyelinase, die zu einer Erhöhung des intrazellulären Ceramidgehaltes führt. Die durch Ceramide aktivierte PKC ζ (Proteinkinase C) phosphoryliert die regulatorische p47^{phox}-Untereinheit der NADP (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat)-Oxidase an Serinresten, was zu deren Aktivierung führt (80). Im Folgenden kommt es zur Selbstorganisation der NADP-Oxidase durch Anlagerung weiterer Untereinheiten an die p47^{phox} und zur Bildung von ROS (reaktive Sauerstoffspezies). ROS-vermittelt kommt es zur Aktivierung der Src-Familien-Kinase Yes, am ehesten durch Hemmung einer Phosphatase, sowie zur lang anhaltenden Aktivierung der JNK1/2 (33;80).

Die aktivierte Yes-Kinase assoziiert mit dem EGF-R und aktiviert diesen durch Tyrosinphosphorylierung, bevor beide Proteine wieder dissoziieren. JNK-vermittelt assoziiert der aktivierte EGF-R dann mit dem CD95 und phosphoryliert diesen an Tyrosinresten, wobei die Phosphorylierung der beiden Tyrosinreste innerhalb der CD95-Todesdomäne (Tyr²³² und Tyr²⁹¹) notwendige Bedingung für die Mikrotubuli-abhängige Membrantranslokation des CD95/EGF-R-Proteinkomplexes und die anschließende Bildung des DISC durch Anlagerung der FADD und der Caspase 8 sind (33;80-84). Die dadurch aktivierte Initiator-Caspase 8 spaltet Bid, das zum Mitochondrium transloziert, wodurch Cytochrom C und Apaf freigesetzt werden. Dies führt zur Aktivierung der downstream liegenden Caspasen 9 und 3. Auch wird auf Ebene der Mitochondrien das ROS-Signal in Anwesenheit von Gallensäuren verstärkt (80). Die mitochondriale Amplifikation des Apoptosesignals führt schließlich zur Apoptose.

Neben der Translokation des CD95 an die Plasmamembran induzieren Gallensäuren auch eine vermehrte Translokation des TRAIL2-Rezeptors und die Suppression von cFLIP, einem

antiapoptotischen Protein, das über die Modulation des Todesrezeptors wirkt; auch eine direkte Toxizität der Gallensäuren auf die Mitochondrien führt zu einer Verstärkung der apoptotischen Signalkaskade (33;46,85;86).

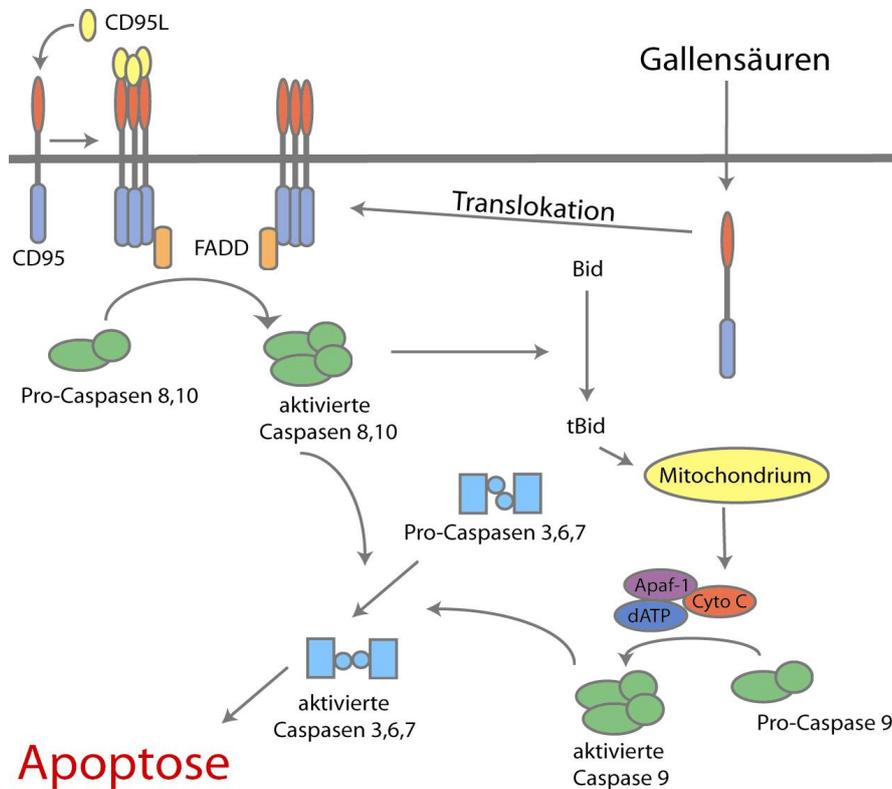


Abbildung 1: Toxische Gallensäuren führen zu einer CD95-vermittelten, Liganden-unabhängigen Apoptose

Bindung von spezifischen Liganden an den CD95 löst eine Apoptose über Aktivierung von Caspasen aus. Die Liganden-unabhängig vermittelte Oligomerisation des Rezeptors in Anwesenheit von Gallensäuren führt ebenfalls Caspase-abhängig zu einer hepatozellulären Apoptose (nähere Erklärungen siehe Text). Modifiziert nach Higuchi (46).

1.2 Gallensäuren

1.2.1 Physiologische Relevanz von Gallensäuren

In Leber, Galle und Darm aller Säugetiere erfüllen Gallensäuren eine Reihe wichtiger physiologischer Funktionen, die insbesondere für den Lipidstoffwechsel von Bedeutung sind (14;48). Die Gallensäuren der Wirbeltiere gehören zur Stoffklasse der Steroide und sind die quantitativ wichtigsten Metabolite von Cholesterin. Zusammen mit Lecithin spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Ausscheidung von freiem Cholesterin aus der Leber. In Galle und Darmlumen sind Gallensäuren sehr wichtige physiologische Emulgatoren.

In der Galle solubilisieren sie Cholesterin und Phospholipide in makromolekularen Aggregaten, den gemischten Mizellen und unilamellaren Vesikeln.

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

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

Als physiologische Detergentien sind Gallensäuren amphipatische Verbindungen; ihre chemische Struktur weist sowohl hydrophobe (Steroidkern und Methylgruppen) als auch hydrophile (Carboxyl- und Hydroxylgruppen) Elemente auf. Die Biosynthese der Gallensäuren findet ausschließlich in der Leber statt. Ausgehend vom Cholesterin werden in Hepatozyten höherer Wirbeltiere durch Hinzufügen einer Carboxylgruppe sowie von Hydroxylgruppen hauptsächlich die primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodeoxycholsäure gebildet. In vivo werden die unkonjugierten Derivate der Gallensäuren mit Glycin oder Taurin konjugiert, so dass sie hydrophile Eigenschaften erhalten. Nach Exkretion der Gallensäuren in die Galleflüssigkeit gelangen sie über die ableitenden Gallenwege ins Duodenum. Die primären Gallensäuren können im Intestinum von anaeroben Bakterien metabolisiert und dabei dehydroxyliert und dekonjugiert werden, wodurch die hydrophoben sekundären Gallensäuren Lithocholsäure und Deoxycholsäure entstehen, die teilweise reabsorbiert werden. Die hepatischen oder intestinalen Metaboliten der sekundären

Gallensäuren werden als tertiäre Gallensäuren bezeichnet. Lithocholsäure wird bakteriell über die Zwischenstufe Ketolithocholsäure in eine tertiäre Gallensäure, die Ursodeoxycholsäure, umgewandelt. Die Ursodeoxycholsäure unterscheidet sich von der Chenodeoxycholsäure nur in der Anordnung der 7 β -Hydroxylgruppe, wodurch sie hydrophilere Eigenschaften als die sekundären Gallensäuren besitzt. Das Mengenverhältnis Chenodeoxycholsäure zu Cholsäure und Deoxycholsäure beträgt 2:2:1; Lithocholsäure und Ursodeoxycholsäure machen nur einen sehr geringen Teil des Gesamtpools der Gallensäuren aus.

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

Einer eingeschränkten Galleausscheidung der Leber kann eine Störung der hepatozellulären Funktion, der hepatozellulären Exkretion der Galle oder des Gallenabflusses zu Grunde liegen; die Cholestase stellt ein Symptom verschiedenster akuter oder chronischer Lebererkrankungen dar (106). In der Pathogenese cholestatischer Syndrome, wie der primär biliären Zirrhose bzw. akuter oder chronischer Virushepatitiden, führt die Akkumulation hydrophober Gallensäuren zu einer hepatozellulären Schädigung (25;46;114). Zudem induzieren Gallensäuren Signalprozesse, die auch für die Signalvermittlung von Zytokinen von Relevanz sind.

1.2.2 Gallensäuren-abhängige Signaltransduktion

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

Eine Steigerung der aktiven Exkretion von Gallebestandteilen (Cholerese) wird durch die hydrophile Gallensäure TUDC (Tauroursodeoxycholsäure) induziert, indem eine Steigerung der kanalikulären Transportkapazität für Gallebestandteile vermittelt wird. Die Induktion der Cholerese beinhaltet ein komplexes Netzwerk von Signalkaskaden, an denen MAP-Kinasen

(“mitogen-activated protein kinase“), die Erks (“extracellular signal-regulated kinase“) und die p38^{MAPK} beteiligt sind (40;58;59) (siehe Abbildung 2).

Stimulation von Integrinen resultiert in einer Tyrosin-Autophosphorylierung der FAK (“focal adhesion kinase“). Der Weg zur Aktivierung der p38^{MAPK} führt nun weiter über die Stimulation der Src-Kinase. Eine PI3-K (Phosphatidylinositol 3-Kinase)-abhängige Aktivierung des Ras-Raf-MEK-Weges führt zur Erk-Aktivierung. An der kanalikulären Membran findet schließlich ein MAPK-abhängiger Einbau der Bsep (“bile salt export pump“) statt (41;59;95).

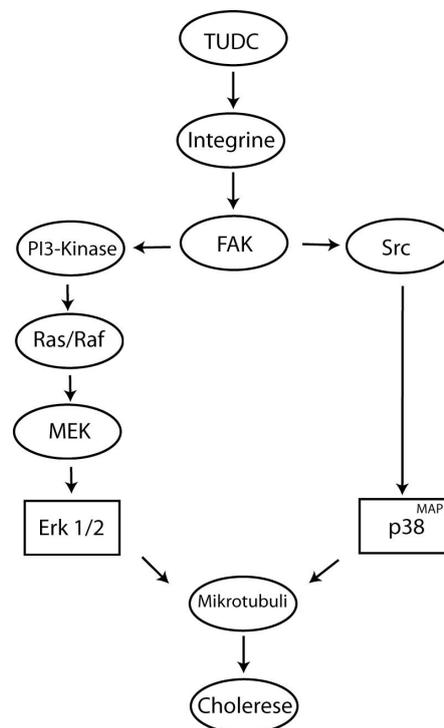


Abbildung 2: TUDC-induzierte Signaltransduktion und Gallensäuren-Exkretion in der Leber

TUDC aktiviert via der Integrine die FAK, welche wiederum Src bzw. die PI3-Kinase aktiviert. Schließlich erfolgt die Aktivierung der MAPK und eine Induktion der Choleresese (nähere Erläuterungen siehe Text). Modifiziert nach Häussinger 2003 (40).

Hydrophobe Gallensäuren wie GCDC (Glykochenodeoxycholsäure) oder TLCS (Tauroolithocholsäure-3-sulfat) können eine Apoptose induzieren. Auf die Apoptose induzierenden Mechanismen in Gegenwart hydrophober Gallensäuren wird in 1.1.4 eingegangen.

TUDC spielt neben cAMP (Adenosin-3', 5'-monophosphat) auch eine Rolle bei der Inhibition der durch Gallensäuren-vermittelten Apoptose (33;35). Durch diese Substanzen wird die

durch GDC- oder TLCS-induzierte lang anhaltende, für die Apoptose der Zelle wichtige JNK-Aktivierung, in eine transiente Aktivierung umgewandelt. Weiterhin wird die Gallensäuren-induzierte CD95-Rezeptoraktivierung blockiert, indem die EGF-R-Phosphorylierung durch TUDC/cAMP inhibiert und eine Phosphorylierung des CD95 im Bereich von Serin- und Threoninresten hervorgerufen wird (33;35;81;84). TUDC hemmt außerdem die für die Induktion der Apoptose essentielle ROS-Generierung durch hydrophobe Gallensäuren, sowie die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C (85;86).

Für die Apoptoseinhibition spielen die durch TUDC aktivierten MAP-Kinasen keine besondere Rolle, da weder die Inhibition der Erks noch der p38^{MAPK} den protektiven TUDC-Effekt gegenüber der TLCS-vermittelten Apoptose aufheben können. So vermitteln unterschiedliche Signaltransduktionswege den choloretischen Effekt von TUDC einerseits und den antiapoptotischen Effekt andererseits (33;59;95).

1.3 Hyperosmolarität

1.3.1 Zellhydratation

Der zelluläre Hydratationszustand ist ein dynamischer Prozess; kleine Volumenänderungen der Zelle, in Form von Zellschwellung und Zellschrumpfung, geschehen binnen Minuten in Reaktion auf Veränderungen der umgebenden Osmolarität, aber auch isoosmotisch unter dem Einfluss von Hormonen, Substraten, Second Messengers oder oxidativem Stress (94). Zellschwellung und Zellschrumpfung wiederum vermitteln Signale, die an zellulären Vorgängen wie Apoptose und Proliferation beteiligt sind (sog. Osmosignalling). Auf diese Weise können Metabolismus und Genexpression der Zelle reguliert werden (39;92).

Allgemein gesagt bedingt eine osmotisch bedingte Zellschwellung einen anabolen Metabolismus, wohingegen die Schrumpfung der Zelle durch Dehydrierung einen Katabolismus fördert. Die Zellen versuchen initial mit kompensatorischen Mechanismen dem veränderten Zellvolumen entgegenzuwirken (z.B. Elektrolytaufnahme oder Freisetzung von Osmolyten). Das Zellvolumen kann jedoch nicht vollständig wiederhergestellt werden, so dass sich dies in Veränderungen der Zellfunktion niederschlägt (94).

Schon moderate Fluktuationen des umgebenden Millieus in Richtung Hyperosmolarität, die an sich von der Zelle gut toleriert werden, können die Zelle gegenüber proapoptotischen Stimuli sensitivieren. Neben der Sensitivierung für den CD95-Signalweg (79;82) (1.1.2) ist eine Aktivierung des TNF-Rezeptor-Signalweges in Anwesenheit von Hyperosmolarität

beschrieben (94). Unter dehydrierenden Bedingungen können die intrazelluläre Akkumulation von organischen Osmolyten, eine Zellzyklusverlangsamung und die Expression von Hitzeschockproteinen eine zelluläre Toleranz gegenüber Hyperosmolarität bedingen.

Unter isoosmotischen Bedingungen kommt es z.B. durch Wachstumsfaktoren, bestimmte Aminosäuren oder apoptotische Stimuli zu Änderungen der Zellhydratation. Die isoosmotische Zellschrumpfung fördert analog der durch Hyperosmolarität bedingten Zellschrumpfung apoptotische Signale (94).

Die isoosmotische Zellschwellung hingegen ist ein obligatorisches Merkmal des Zellzyklusses, indem Zellschwellung in mitogenen Signalwegen mündet und die Zelle vor Apoptose, Hitze und oxidativem Stress schützt. Glutamin, Ethanol und Insulin führen über eine Zellschwellung zur Cholerease und Inhibition der autophagischen Proteolyse der Zelle. Iso- als auch anisoosmotisch bedingte Zellschwellung führt weiterhin zu einer vermehrten Protein- und Glykogensynthese und inhibiert die Gluconeogenese, wodurch z.B. die physiologischen Insulineffekte erklärt werden können (91).

Hypoosmolares Milieu verbessert die hepatische Resistenz gegenüber oxidativem Stress (40;110).

Die Rolle der Zellhydratation für die Proliferation bzw. Apoptose der Zelle muss im klinischen Alltag bedacht werden, da sie einen großen Einfluss auf die Körperphysiologie ausübt (93). Schon mäßig hyperosmolare Zustände, z.B. bei Hybernatriämie, sind in der Lage eine Translokation von CD95 zur Zellmembran zu bewirken und die Leberzelle damit für apoptotische Stimuli zu sensitivieren (82). Die therapeutische Effektivität von Medikamenten, die das CD95-System aktivieren können, ist demnach stark von dem Zustand der Zellhydratation beeinflusst. Analog kann es bei Transplantationen mit Organen von hypernatriämen Spendern zur Dysfunktion der Organe kommen. Auch bei der therapeutischen Applikation von organischen Osmolyten muss auf die Konsequenzen infolge der Zellveränderungen geachtet werden (94).

1.3.2 Hyperosmotisch-bedingte Signaltransduktion und deren Bedeutung für die hepatozelluläre Apoptose

Der Todesrezeptor CD95 liegt in Hepatozyten unter normoosmotischen Bedingungen vorwiegend intrazellulär vor. Unter hyperosmotischen Bedingungen (405 mosmol/l) transloziert CD95, ähnlich den Vorgängen unter Gallensäureeinwirkung, Liganden-unabhängig zur Plasmamembran. Jedoch kommt es hier nicht zur Liganden-unabhängigen

Oligomerisierung des Rezeptors und Auslösung der Apoptose, sondern zur Sensitivierung der Hepatozyten gegenüber dem CD95 Liganden abhängigen Apoptoseweg und darauffolgend zur Aktivierung der Caspase 3 und Caspase 8 (siehe 1.1.2).

Der Translokation des CD95-Rezeptors zur Plasmamembran gehen verschiedene Schritte voraus. Hyperosmolarität induziert eine rasche endosomale Ansäuerung, welche die Aktivierung der sauren Sphingomyelinase mit konsekutiver Ceramid-Bildung bedingt. Ceramide wiederum aktivieren die PKC ζ , die eine NADPH-Oxidase-Aktivierung und Generierung von ROS triggert. Dies geschieht durch eine PKC ζ -abhängige Serin-Phosphorylierung der p47^{phox} (79). Der oxidative Stress führt zur Aktivierung der Yes-Kinase, einem Mitglied der Src-Kinasen-Familie. Aktiviertes Yes assoziiert mit dem EGFR, der durch die Yes-Kinase Tyrosin-phosphoryliert und aktiviert wird, bevor beide wieder dissoziieren. Weiterhin wird die JNK in Anwesenheit der Yes-Kinase aktiviert. Beide Signale, die JNK und der phosphorylierte EGF-R, wirken zusammen und führen zu Assoziation des EGF-R mit dem CD95. Der CD95 stellt mit seinen Tyrosinresten Tyr²³² und Tyr²⁹¹ ein Substrat für die EGF-R-Kinase-Aktivität dar. Nach Phosphorylierung des CD95 und Oligomerisierung des Rezeptors folgt die Mikrotubuli-abhängige CD95-Rezeptor-Translokation zur Membran und es wird schließlich die DISC-Formation induziert (FADD/Caspase8/CD95) (83) (siehe Abbildung 3).

Auf Grund der transienten JNK-Aktivierung und der Aktivierung eines antiapoptotisch wirkenden Erk-Signals ist die Translokation des CD95 teilweise reversibel und Hyperosmolarität alleinig nicht potent genug - trotz Fähigkeit der Caspasen-Aktivierung - eine Apoptose auszulösen (82).

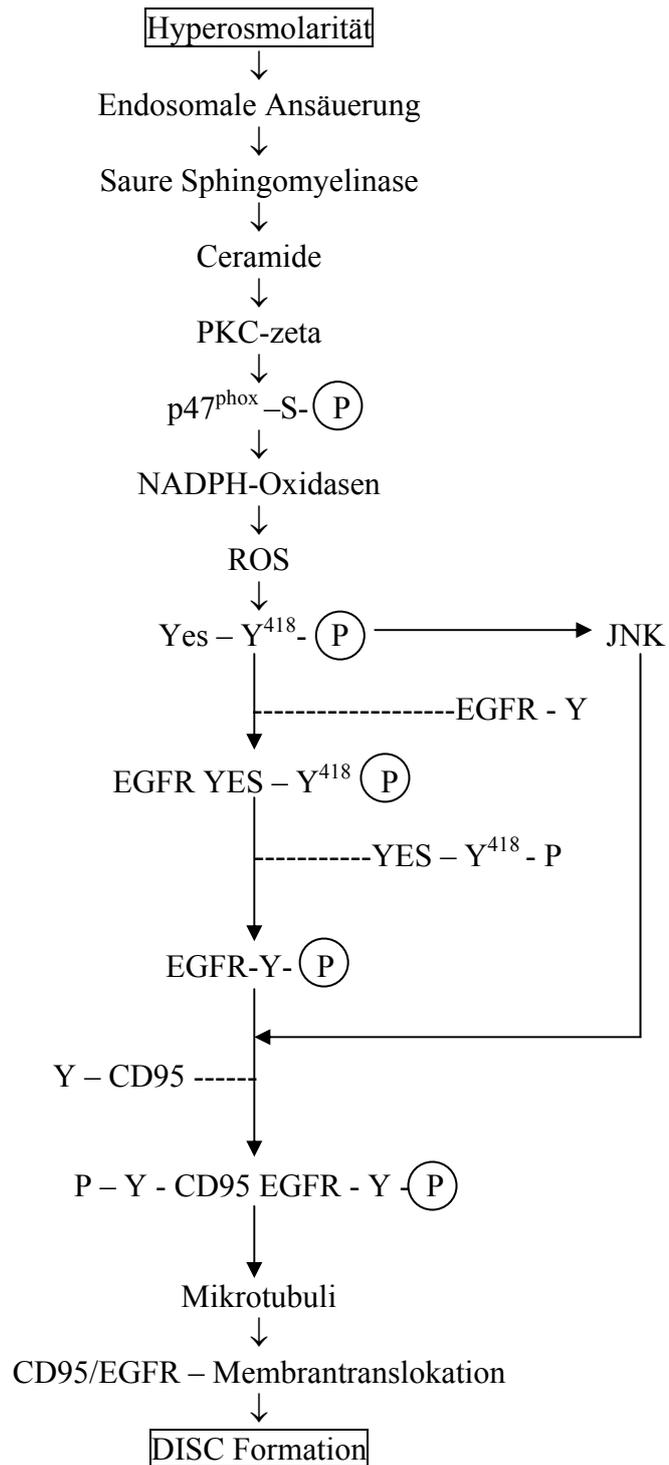


Abbildung 3: Hyperosmotisch-bedingte Signaltransduktion und Aktivierung des CD95-Signalweges
 Die Abbildung skizziert den Ablauf der hyperosmotisch induzierten Aktivierung des CD95-Systems, für nähere Erläuterungen siehe Text. Nach Reinehr 2006 (79).

1.4 Interleukin-6: Signaltransduktion und physiologische Bedeutung

Interleukin-6 (IL-6) besitzt eine wichtige Rolle für die Erhaltung der hepatischen Homöostase im Rahmen von verschiedenen pathologischen Ereignissen, und es aktiviert Zielgene, die beteiligt sind an der Differenzierung, Apoptose, Proliferation und der Akut-Phase-Antwort (43;44;73;103).

Der an der Signaltransduktion von IL-6 beteiligte Rezeptor (R) wird unterteilt in den Liganden-spezifischen α -Rezeptor (IL-6R α , gp80), der keine intrazelluläre Signaltransduktion vermitteln kann, und die Signaltransduktion-vermittelnde Untereinheit gp130. Nach Anbindung von IL-6 an die α -Untereinheit des Rezeptors erfolgt die Rekrutierung und Dimerisierung von gp130. Die Tyrosinkinase der Janus Familie (Jak1 und 2) sind zu der Rezeptoruntereinheit des gp130 assoziiert und werden nach Aktivierung des gp130 autophosphoryliert, was konsekutiv zu einer Tyrosin-Phosphorylierung des gp130 sowie der STATs ("signal transducer and activator of transcription") führt. Die STATs dimerisieren und translozieren in den Zellkern. Die STAT-Familie der Transkriptionsfaktoren umfasst sieben verschiedene Mitglieder (STAT1, -2, -3, -4, -5a, -5b und 6), welche mit der Ausnahme von STAT4 ubiquitär exprimiert werden. Die Aktivität der STATs wird vor allem durch eine Phosphorylierung von spezifischen Serin- und Tyrosinresten vermittelt. IL-6-Stimulation führt über gp130 zur STAT3-Phosphorylierung (Tyrosin⁷⁰⁵) und zu einem geringeren Ausmaß auch zu einer STAT1-Phosphorylierung (Tyrosin⁷⁰¹). Nach Translokation in den Kern interagieren die STATs mit enhancer elements in Promotoren von Zielgenen und führen so zur Induktion derer Transkription, möglicherweise in Einzelfällen auch zur Repression. Neben der Tyrosinphosphorylierung von STATs können STAT1 und STAT3 ebenfalls im Bereich von Serin⁷²⁷ phosphoryliert werden, welches eine erhöhte transkriptionelle Aktivität zur Folge hat (43).

IL-6 stimuliert neben dem Jak/STAT-Signalweg den MAPK-Signalweg. Im Fall von gp130 erfolgt eine Rekrutierung der sog. "SH2-domain-containing tyrosine phosphatase" (SHP2) zur zytoplasmatischen Domäne des IL-6 Rezeptors. Anschließend wird die 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-Kinase- und MAPK-Aktivierung führt (43) (siehe Abbildung 4).

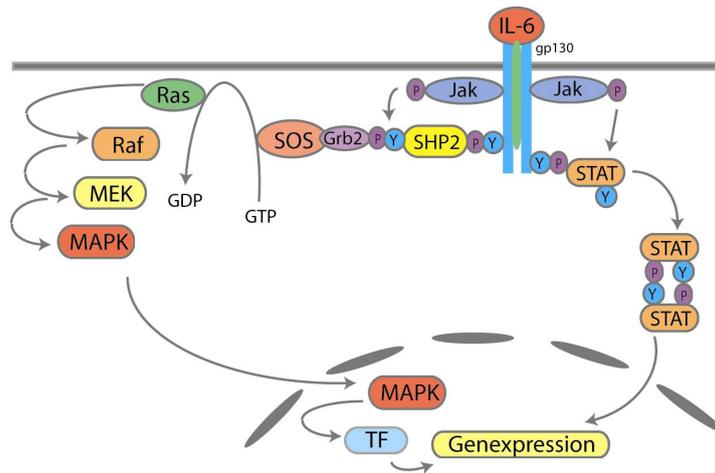


Abbildung 4: Interleukin-6 aktiviert den Jak/STAT-Signalweg und die MAPK-Kaskade

Darstellung der beiden Signalwege, die durch IL-6-Typ-Zytokine aktiviert werden (nähere Erläuterungen siehe Text). Modifiziert nach Heinrich 2003 (43).

Für die Terminierung des Zytokinsignals sind verschiedene Mechanismen beschrieben worden (56;112). In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auf den Jak/STAT-Pathway inhibierend wirkende Zytokine dies durch die Expression von Molekülen vermitteln. Neben den “protein inhibitors of activated STATs“ (PIAS) kommt der Familie der “suppressor of cytokine signalling“ (SOCS) eine wesentliche Rolle zu. Weiterhin kann durch spezifische Tyrosinphosphatasen, den sog. SHP2s, eine Dephosphorylierung von Jaks oder STATs erfolgen (siehe Abbildung 5 und Abbildung 6).

Zur Gruppe der PIAS zählen neben den für den STAT-Signalweg wichtigen PIAS1 und PIAS3 auch PIAS α , PIAS β und PIAS γ . Sie sind Hemmer des STAT-Signallings, indem sie als zytoplasmatische Faktoren die Bindung von aktivierten STAT-Komplexen an die DNA hemmen.

SOCS3 und SOCS1 inhibieren hauptsächlich die Kinase-Aktivität von Jak2, indem sie mit ihrer zentralen SH2-Domäne und ihrer KIR (“kinase inhibitory region“), die als nicht phosphoryliertes Pseudosubstrat wirkt, an die katalytische Region von Jak2 binden (71). SOCS3 besitzt andererseits die Fähigkeit an phosphorylierte Tyrosine der Zytokinrezeptoren wie gp130 (Tyr⁷⁵⁹) zu binden und so die Anbindung von STATs zu blockieren. Da die Genregulation von SOCS-Proteinen STAT-abhängig ist, üben SOCS1 und SOCS3 über die Inhibition der STAT3-Phosphorylierung einen negativen Effekt auf ihre eigene Expression aus, wodurch einer zellulären Akkumulation von SOCS-Proteinen entgegengesteuert wird.

Die Protein-Tyrosin Phosphatase SHP2 übt, neben positiver Wirkung auf die Aktivierung der MAPK, als Gegenspieler der phosphorylierenden Kinasen auch eine inhibierende Funktion

auf den Jak/STAT-Signalweg aus (64). Tyk2, Jak1 und Jak2 dienen als Substrate von SHP2, welches die IL-6-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung der Substrate durch Dephosphorylierung vermindert.

Auch der Abbau von STAT-Faktoren über das Proteasom führt zur Inaktivierung des Jak/STAT-Pathways. Weiterhin können Expressionsveränderungen von STATs Einfluss auf das Signalling nehmen (53).

Ein inhibierender Einfluss von anderen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α) und LPS (Lipopolysaccharid) auf die IL-6 induzierte Signaltransduktion wurde in der Vergangenheit in verschiedenen Zelltypen untersucht (12;13). 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 (18). Für toxische Gallensäuren wurde eine Caspase-abhängige Degradation des gp130 und ein p38^{MAPK}-abhängiger inhibierender Einfluss auf die IL-6-induzierte STAT-Aktivierung gezeigt (32).

Im Rahmen von Entzündungsreaktionen wird durch IL-6 die hepatische Produktion von Akut-Phase-Proteinen induziert wie z.B. das C-reaktive Protein, α_2 -Makroglobulin, Fibrinogen, "tissue inhibitor of metalloproteinase-1" (TIMP1) und α_1 -Antichymotrypsin. Während cholestatischer Syndrome erfolgt eine verstärkte Expression von IL-6 und anderer Zytokine (z.B. TNF- α) mit erhöhten Serumspiegeln bei den jeweiligen Patienten, wodurch ein proliferationsfördernder und hepatoprotektiver Einfluß vermittelt wird (52;72). Die essentielle Rolle von IL-6 für die hepatische Homöostase im Rahmen der Inflammation wird in Studien mit IL-6-Knockout-Tieren deutlich, da diese eine vermehrte Anfälligkeit für hepatotoxische Substanzen wie z.B. Endotoxine zeigen (23;54;98). Die Rolle von IL-6 für die Leber-Regeneration hingegen wird kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite gilt IL-6 als Vermittler der Hepatozyten-Proliferation. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass nach partieller Hepatektomie die Leberregeneration in IL-6-defizienten Tieren stark vermindert ist (20). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass IL-6 nach partieller Hepatektomie protektive Signalwege induziert, ohne einen signifikanten Einfluss auf die Hepatozyten-Proliferation zu nehmen. Überstimulation mit IL-6 führte sogar zu Inhibition der Hepatozyten-Proliferation (9;113).

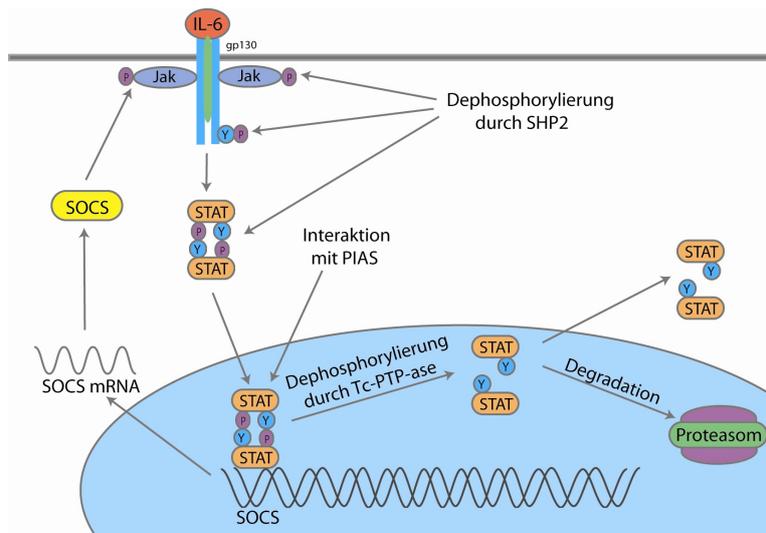


Abbildung 5: Terminierung des IL-6-Signalweges

Darstellung der Interleukin-6-Signalterminierung durch SOCS, PIAS und SHP2 (nähere Erläuterungen siehe Text). Modifiziert nach Heinrich 2003 (43).

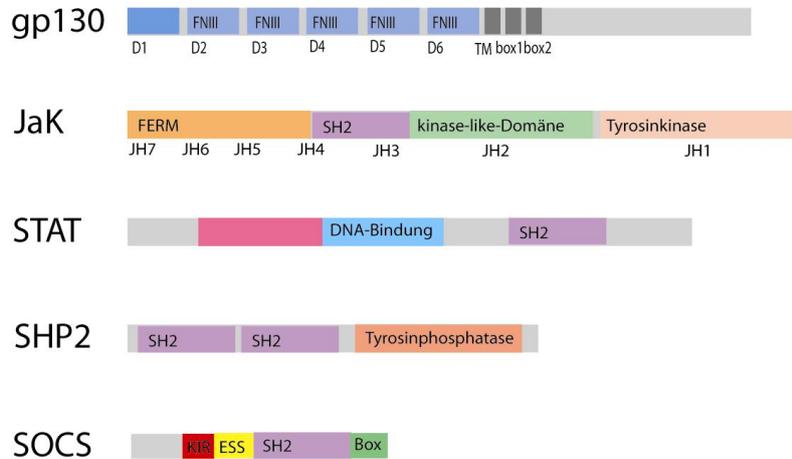


Abbildung 6: Strukturelle Organisation verschiedener Komponenten der Signalübertragung von IL-6-Typ-Zytokinen

Nähere Erklärungen zu den Interaktionen der einzelnen Komponenten siehe Text. Aus Heinrich 2003 (43).

1.5 Typ I-Interferone: Signaltransduktion und physiologische Relevanz von IFN- α

Interferone (IFN) stellen eine große Familie pleiotroper Zytokine dar, die im Rahmen eines viralen Infektes induziert und sezerniert werden, um eine zelluläre antivirale Antwort auszulösen (37;75;87). Interferone werden in zwei große Gruppen, Typ I und Typ II Interferone, eingeteilt. Die Typ I Interferone sind eine Genfamilie, die aus einem IFN- β -Gen und mindestens zwölf IFN- α -Genen bestehen. Zur Gruppe der Typ II Interferone gehört nur Interferon γ .

Interferon- α wird vor allem von Leukozyten und Interferon- β hauptsächlich von Fibroblasten gebildet. Interferone des Typ I interagieren mit ihrem spezifischen Oberflächenrezeptor, der aus den zwei Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 besteht. Bereits vor Stimulation der Rezeptoren besteht eine Assoziation von Tyk2 an IFNAR1 und von Jak1 an IFNAR2. Nach Anbindung von IFN- α assoziieren IFNAR1 und IFNAR2 miteinander, so dass ein Heterodimer entsteht und Tyk2 und Jak1 werden im Rahmen einer Autophosphorylierung aktiviert. Tyk2 phosphoryliert dann den IFNAR1 im Bereich des Tyrosins 466, so dass eine Andockungsstelle für STAT2 über seine SH2-Domäne generiert wird. STAT2 wird dann wiederum durch Tyk2 im Bereich des Tyrosin (Tyr⁶⁹⁰) phosphoryliert, so dass STAT1 über seine SH2-Domäne an STAT2 binden kann. STAT1 wird daraufhin im Bereich des Tyrosin 701 phosphoryliert. Das STAT1/2-Heterodimer dissoziiert im Folgenden vom Rezeptor und bildet mit p48 – auch als “Interferon regulatory factor“ (IRF)-9 bezeichnet - den als “Interferon stimulated gene factor 3“ (ISGF-3) benannten Komplex. p48 besitzt eine DNA-Bindungsdomäne, so dass der ISGF-3-Komplex an sogenannten “Interferon stimulated response element“ (ISRE)-Promoterelemente bindet. Letztlich resultiert dies in der Transkriptionsinduktion Interferon α/β -stimulierter Gene (29;62;66;109).

IFN- α induziert die Transkription von verschiedenen Proteinen wie z.B. PKR (Proteinkinase R), OAS (“2'-5' oligoadenylate synthetase“) und sog. Mx-Proteine, die unter anderem durch Hemmung der Translation oder Induktion der Apoptose von Virus-infizierten Zellen antiviral wirken (37;75;87). Daneben vermittelt IFN- α antiproliferative und immunmodulatorische Wirkungen.

Die PKR liegt in einer inaktiven Form vor und wird durch Autophosphorylierung nach Bindung an doppelsträngige RNA aktiviert. Infolge dessen werden mindestens sechs verschiedene Proteinsubstrate phosphoryliert. Als wichtigstes hiervon ist der Translationsinitiationsfaktor eIF-2- α zu nennen, welcher in Virus-infizierten Zellen für die

Translation viraler mRNA von großer Bedeutung ist und nach Phosphorylierung inaktiviert wird. Es kommt zur Inhibition sowohl von zellulärer RNA als auch viraler RNA, somit kann sich einerseits das Virus nicht mehr vermehren, andererseits führt der zelluläre Translationsstop zur Apoptose (77;105).

Das OAS-System wird ebenfalls von doppelsträngiger RNA stimuliert. Die durch dsRNA aktivierte OAS synthetisiert Oligodeenylate, welche eine 2', 5'-Phosphordiesterbindung enthalten. Nach Bindung dieser an die RNaseL wird selbige aktiviert. Die Aktivierung der RNaseL führt wiederum zur Degradation von in der Zelle vorhandener viraler und zellulärer RNA (101).

Das MxA-Protein ist in der Lage, die Replikation von RNA-Viren zu unterbinden. Es wird vermutet, dass unter anderem die Aktivität oder das „Trafficking“ der viralen Polymerasen inhibiert wird (38).

Die Terminierung des IFN- α -Signals wird mit dem Ziel der Prävention einer Überstimulation über PIAS, SOCS-Proteine (SOCS1/3) und SH2-Phosphatasen vermittelt (56;112).

Zur Gruppe der PIAS zählen neben den für den STAT-Signalweg wichtigen PIAS1 und PIAS3 auch PIAS α , PIAS β und PIAS γ . Sie sind Hemmer des STAT-Signallings, indem sie als zytoplasmatische Faktoren die Bindung von aktivierten STAT-Komplexen an die DNA hemmen. PIAS1 ist spezifisch für die Inhibition der STAT1-medierten Geninduktion (67).

Die Gruppe der SOCS wird synonym JAB („Jak-binding protein“), SSI („STAT-inducible STAT inhibitor“) und CIS („cytokine inducible SH2 protein“) genannt (4). Die SOCS-Familie umfasst acht Proteine, die als CIS sowie SOCS1 bis SOCS7 klassifiziert werden. Im Fall von SOCS1 und SOCS3 wird durch Bindung an die Janus-Kinasen deren Kinase-Aktivität inhibiert, indem sie als Pseudosubstrat dienen. Da die Gegenregulation von SOCS-Proteinen STAT-abhängig ist, üben SOCS1 und SOCS3 über die Inhibition der STAT-Phosphorylierung einen negativen Effekt auf ihre eigene Expression aus, wodurch einer zellulären Akkumulation von SOCS-Proteinen entgegengesteuert wird.

Einen anderen Inhibitionsmechanismus üben die Tyrosinphosphatasen SHP1 und SHP2 aus (70). Sie interagieren mit dem intrazytoplasmatischen Teil der Zytokinrezeptoren und dephosphorylieren die Janus-Kinasen.

Weiterhin führen die Degradation von STAT-Faktoren über das Proteasom (51) und die Dephosphorylierung der in den Zellkern translozierten STAT-Faktoren durch eine Tyrosin-Phosphatase (42) zur Inaktivierung des Jak/STAT-Pathways.

2. Fragestellung

Ziel dieser Untersuchung war die Identifikation von Signalelementen des IL-6-Signallings, die durch den CD95 Liganden modifiziert werden und die Analyse des zugrundeliegenden Mechanismus. Zudem sollte der Einfluss proapoptotischer Stimuli auf den IFN- α -Signalweg untersucht werden.

3. Materialien und Methoden

3.1 Isolation von primären Rattenhepatozyten und Zellkultur

Mittels Kollagenaseperfusion wurden isolierte Hepatozyten von männlichen Wistar-Ratten gewonnen (99); $1,5 \times 10^6$ Zellen wurden auf mit Kollagen beschichteten Kulturschalen (36 mm Durchmesser) ausplattiert und zunächst für zwei Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ in Krebs-Henseleit-Puffer (in mmol/l: NaCl: 115, NaHCO₃: 25, KCl: 5.9, MgCl₂: 1.18, NaH₂PO₄:1.23, Na₂SO₄: 1.2 und CaCl₂: 1.25) supplementiert mit 6 mmol/l Glucose belassen. Im Anschluss daran wurden die Zellen zweimal gewaschen und für 24 Stunden in 1.5 ml Williams E Medium kultiviert, supplementiert mit 2 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. Zwei Stunden vor Beginn des Experimentes wurden die Zellen erneut gewaschen und mit 1.5 ml Williams E Medium inkubiert, supplementiert mit Glutamin (2 mmol/l), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (0,1 mg/ml) und FCS (5 %, "fetal calf serum"). Die Viabilität der Hepatozyten wurde durch Trypanblau-Färbung bestimmt und betrug mehr als 95 %.

Weiterhin wurden HepG2-Zellen kultiviert, die, wenn indiziert, mit dem NTCP ("Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide")-Plasmid stabil transfeziert wurden (gekoppelt an EGFP "enhanced green fluorescent protein") (57). Das HepG2-Medium bestand aus MEM ("minimal essential medium"), supplementiert mit 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren, 1 mmol/l Natriumpyruvat, 2 mmol/l Glutamin und 10 % FCS, nach Transfektion zusätzlich supplementiert mit 400 mg/l Geneticin.

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

Das Medium wurde nach Ablauf der Inkubationszeiten (Inhibitoren vor den Gallensäuren für 30 min, Gallensäuren 1-6 h, danach IL-6 für 20 min) entfernt, und die Hepatozyten bzw. NTCP-HepG2-Zellen wurden unmittelbar bei 4 °C mit einem Puffer (20 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4), 140 mmol/l NaCl, 10 mmol/l NaF, 10 mmol/l Natriumpyrophosphat, 1 % Triton X-100, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l EGTA, 1 mmol/l Natriumvanadat, 20 mmol/l β-Glycerophosphat

und Protease-Inhibitor-Cocktail) lysiert. Die Homogenisate wurden bei 20000 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert und die Überstände bei –20 °C gelagert.

3.2 Proteinbestimmung

Basierend auf der Methode nach Bradford (15) erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration. Basische Aminosäurereste von Proteinen bilden mit dem Farbstoff Comassie Brilliant Blue G-250 ionische Komplexe aus. Die Bindung dieses Farbstoffs an Proteine bewirkt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm (rot) auf 595 nm (blau), gleichzeitig steigt die Absorption bei 595 nm an; bei der Konzentrationsbestimmung der Proteine wird diese Änderung verfolgt.

Durchgeführt wurde die Proteinbestimmung in 1 ml Einwegküvetten. 5 µl des Lysats der NTCP-HepG2-Zellen wurden mit 20 µl Wasser verdünnt, zum Lysat der Hepatozyten wurden 40 µl Wasser hinzugegeben. Ein Ansatz enthielt 5 µl des jeweiligen verdünnten Lysats und 795 µl Wasser. Durch Zugabe von 200 µl Bradfordreagenz und Mischen des Küvetteninhaltes wurde die Reaktion gestartet. Nach 20 min konnte die Extinktion im Photometer bei 595 nm gemessen werden. In einer Eichgerade wurden die Extinktionen von BSA (bovines Serumalbumin)-Lösungen gegen deren bekannte Konzentrationen dargestellt, und anhand der gemessenen Extinktion der Probe konnte die Proteinkonzentration in der Probe bestimmt werden.

3.3 Westernblot

Gesamtproteinlysat wurde mit 1 Vol. Probenpuffer (0.1 M Tris (pH 6.8), 20 % Glycerin, 3.5 % SDS, 200 mmol/l Dithiothreitol, 0.1 % Bromphenolblau) versetzt und nach fünfminütiger Inkubation bei 95 °C mittels SDS (Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (60 µg Protein, 10%-Gel). Die Gele wurden anschließend mit Transferpuffer (Glycin: 39 mmol/l, Tris/HCl 48 mmol/l, 0.03 % SDS, 20 % Methanol) equilibriert und die Proteine mittels eines „semi dry transfer“ Apparates auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Durch Behandlung mit 5 % BSA (in TBST: 20 mmol/l Tris/HCl (pH 7.5), 150 mmol/l NaCl, 0.1 % Tween) bzw. 5 % Milchpulver (in TBST) wurden die Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert. Die Membranen wurden nach kurzem Waschen mit TBST bei 4 °C drei bis vier Stunden mit dem ersten Antikörper in einer

Verdünnung von 1:2000 inkubiert (Antikörper: gp80, gp130, STAT3, STAT1, phosphospezifisches STAT3 (Tyr⁷⁰⁵), phosphospezifisches STAT1 (Tyr⁷⁰¹), GAPDH [Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase]. Nach 30minütigem Waschen der Membran erfolgte die Inkubation mit einem an Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper (Anti-Hase Immunglobulin G bzw. bei GAPDH Anti-Maus Immunglobulin G in der Verdünnung 1:10000) über 2 Stunden bei Raumtemperatur. Die Antikörperreaktion wurde nach erneutem Waschen mit dem ECL (“enhanced chemiluminescence“)-System detektiert.

3.4 Real Time PCR

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Die Spezifität der RT-PCR wurde über Negativkontrollen in Form von Ansätzen ohne cDNA (NTC, “non-template-control“) bzw. ohne RT kontrolliert. Semiquantitative PCR-Ergebnisse wurden über die $\Delta\Delta CT$ -Methode erworben (61). Schwellenwerte wurden zu HPRT1 normalisiert und in Referenz zu unstimulierten Kontrollzellen gesetzt.

3.5 Statistik

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

3.6 Materialien

Geräte	Typenbezeichnung	Firma
Elektroblottingapparat	semi dry transfer Horizontal- apparat, Multiphor II	Pharmacia, Freiburg
Elektrophoresekammer	Z37, 507-1	Sigma-Aldrich, Steinheim
Entwicklermaschine	Agfa Curix 60	Agfa, München
PCR System	7500 Real-time PCR	Applied Biosystems, Forster City, USA
RNA/DNA Kalkulator		GeneQuant II, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Spectrophotometer	4054 UV	LKB Biochrom, Cambridge, England
Thermoblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Mikro 24-48	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge	5415	Eppendorf, Hamburg
Waage	BP 1200	Sartorius, Göttingen
(Verbrauchs-)Material	Typenbezeichnung	Firma
Einmal-Injektions-Kanüle	Ø 0,9 x 40 mm	Braun, Melsungen

Einmal-Spritze	20 ml	Braun, Melsungen
Einweg-Gewebekulturflasche	75 cm ² Wachstumsfläche	Greiner Bio-One, Solingen
Einweg-Gewebekulturschale	100 / Ø 20 mm	Greiner Bio-One, Solingen
Einweg-Pipette	Costar Stripette	Corning, München
Einweg-Sterilfilter	FP 30 / Ø 0,2 CA-S	Schleicher & Schüll, Dassel
Entwicklerflüssigkeit	enhanced chemiluminescent detection system; Super Signal West Pico	Pierce, Rockford, IL, USA
Filterpapier	Whatman Gelblottingpapier GB002	Schleicher & Schüll, Dassel
Fluoreszenzfarbstoff	SYBR [®] Green Universal PCR MasterMix	Qiagen, Hilden
Glasspritze	Hamilton Microliter	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Nitrozellulosemembran	Whatman Protran	Schleicher & Schüll, Dassel
Pipetten	Variable Mikroliter-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße		Eppendorf, Hamburg
Reverse Transkriptions-Set	QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNA-Isolierungs-Set	Rneasy Mini Kit /QIA Shredder	Qiagen, Hilden
Röntgenfilm	Hyperfilm-ECL	Amersham, Buckinghamshire, England
Sixwell-Gewebekulturplatte		Greiner Bio-One, Solingen
96-Well-Reaktionsplatten		Applied Biosystems, Forster City, USA

Reagentien

Firma

Bafilomycin A	Alexis Biochemicals, San Diego, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biochrom, Berlin
CD95L	Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz
D-MEM/F12 (1:1) + Glutamax	Gibco, Paisley, Schottland

Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Eggenstein
Geneticin	Gibco, Paisley, Schottland
Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München
Glykochenodesoxycholol (GCDC)	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München
IL-6	Biosource, Camarillo, USA
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Interferon- α	Roche, Grenzach-Wyhlen
Interleukin-6	Biosource, Camarillo, USA
MG 132	Calbiochem-Novabiochem Gmbh, Bad Soden
Non-Fat Dry Milk	Bio-Rad, München
Oligonukleotide	MWG Biotech, Ebersberg
Penicillin - Streptomycin	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau S	Serva, Heidelberg
Protease-Inhibitor-Cocktail	Boehringer, Mannheim
Protein-Molekulargewichtsmarker Multimark	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
Protein-Molekulargewichtsmarker Rainbow	Amersham Pharmacia Biotech. Buckinghamshire, England
Trypsin/EDTA Solution	Biochrom, Berlin
Williams E Medium	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München
Z-IETD-FMK (Caspase 8 Inhibitor)	R+D, Wiesbaden
Z-DEVD-FMK (Caspase 3 Inhibitor)	R+D, Wiesbaden

Antikörper

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

 Anti Maus IgG, Peroxidase gekoppelt
 Anti MxA

Firma

Biodesign International, Saco, USA
 Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA
 Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA
 Amersham Pharmacia Biotech.
 Buckinghamshire, England
 Amersham Pharmacia Biotech.
 Buckinghamshire, England
 Otto Haller, Virologie, Uniklinikum Freiburg

Anti PARP	BD Pharmingen, San Diego, USA
Anti Phospho-STAT 1 (Tyr ⁷⁰¹)	New England Biolabs, Beverly, USA
Anti Phospho-STAT 3 (Tyr ⁷⁰¹)	New England Biolabs, Beverly, USA
Anti STAT 1	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA
Anti STAT 3	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA

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

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss von CD95L und Hyperosmolarität auf den IL-6-Signalweg

4.1.1 Einfluss des CD95L und Hyperosmolarität auf die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung und gp130-Expression

Die Apoptose der Zelle kann unter anderem durch die Bindung zugehöriger Liganden (z.B. CD95L) an sog. Todesrezeptoren in der Zellmembran ausgelöst werden (siehe 1.1.2).

In dieser Arbeit wird nun der Effekt von CD95 Ligand sowie Hyperosmolarität (siehe 1.3.1) auf die IL-6-vermittelte Signaltransduktion untersucht.

Stimulation von 24 Stunden kultivierten primären Rattenhepatozyten mit CD95L führt zu einer zeitabhängigen Hemmung der IL-6-induzierten STAT3-Phosphorylierung (Tyr⁷⁰⁵) ohne die STAT3-Proteinexpression zu beeinflussen (Abbildungen 7, 8). Parallel zu der Inhibition der STAT3-Phosphorylierung tritt eine zeitabhängige Herunterregulation des gp130 auf (Abbildungen 7, 9), wobei die gp80-Expression unverändert bleibt.

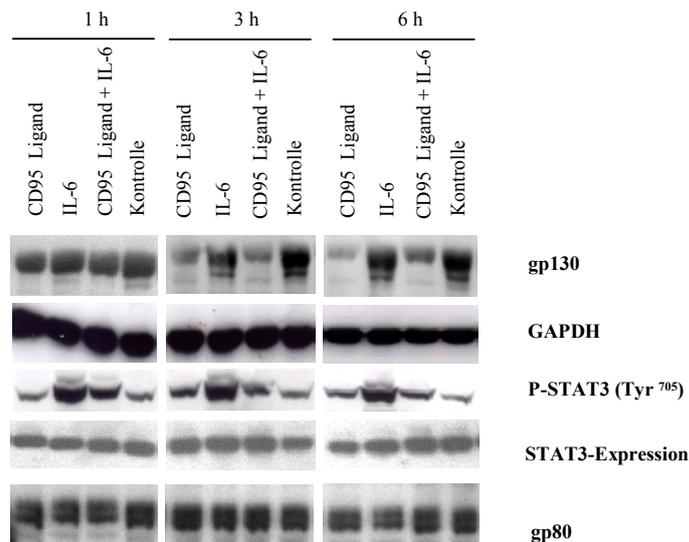


Abbildung 7: Einfluss des CD95 Liganden auf die STAT3-Phosphorylierung und die gp130-Expression

Primäre Rattenhepatozyten wurden ohne (Kontrolle) oder mit CD95 Ligand (100 ng/ml) für die angegebenen Zeitperioden (eine bis sechs Stunden) präinkubiert. Zum angegebenen Zeitpunkt wurde IL-6 (10 ng/ml) für weitere 20 Minuten nach der CD95 Ligand-Präinkubationszeit hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das Gesamtprotein (80 µg) im Immunoblot aufgetragen. Mittels eines spezifischen Antikörpers für die zytoplasmatische Domäne erfolgte die Detektion von gp130. GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) diente als Ladungskontrolle und wurde ebenfalls mittels des entsprechenden spezifischen Antikörpers bestimmt. Weiterhin wurde die STAT3-⁷⁰⁵Y-Phosphorylierung, das Gesamt-STAT3-Protein sowie die gp80-Expression mittels spezifischer Antikörper bestimmt.

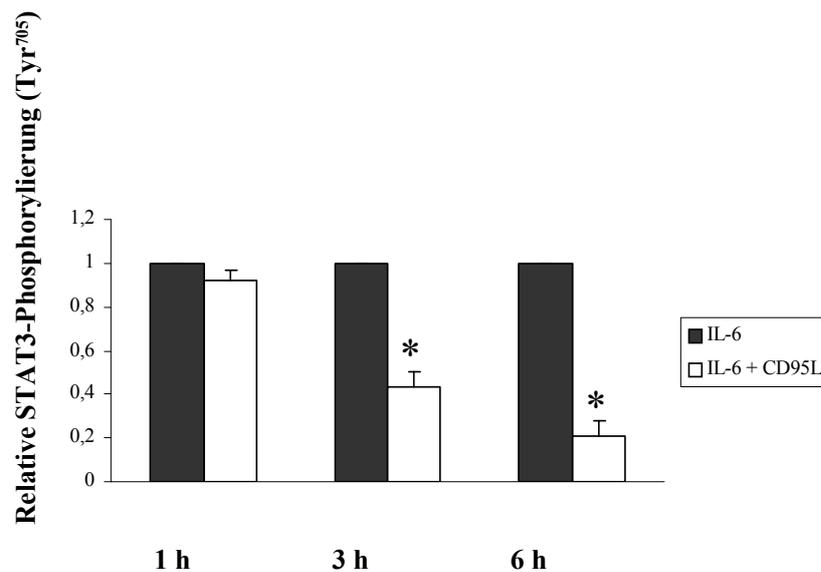


Abbildung 8: Relative Phosphorylierung von STAT3 in Anwesenheit von IL-6 bzw. IL-6 und CD95L. Primäre Rattenhepatozyten wurden ohne (Kontrolle) oder mit CD95 Ligand (100 ng/ml) für die angegebenen Zeitperioden (eine bis sechs Stunden) präinkubiert. Zum indizierten Zeitpunkt wurde IL-6 (10 ng/ml) für weitere 20 Minuten nach der CD95 Ligand-Präinkubationszeit hinzugegeben. Die relative STAT3-Phosphorylierung in Hepatozyten wurde mittels Densitometrie gemessen, wobei die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung als 1 festgelegt wurde. Die Daten werden ausgedrückt als Mittelwerte ± S.E.M. (Standardabweichung des Mittelwerts) (n=4) * P < 0.05.

Nach annähernd einer Stunde Präinkubation mit CD95L beginnt die Herunterregulation des gp130 und erreicht nach drei Stunden ein signifikantes Ausmaß (Abbildung 9).

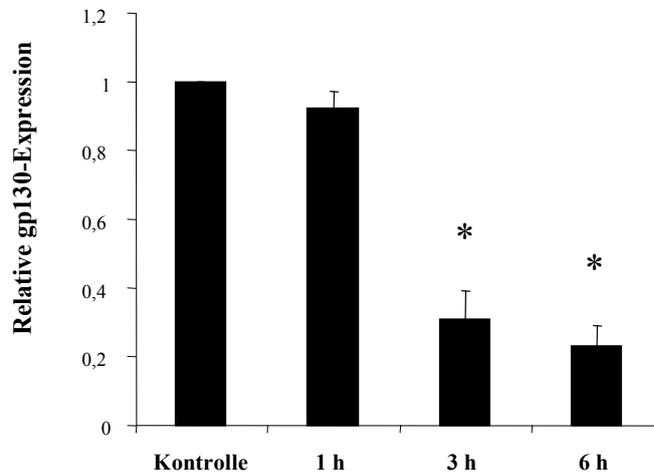


Abbildung 9: Relative Expression von gp130 nach Inkubation mit CD95L

Mittels Densitometrie wurde die relative gp130-Expression in Anwesenheit von CD95L in Hepatozyten gemessen; die Daten werden in Relation zu den jeweiligen Spiegeln der unstimulierten Kontrollen gesetzt, welche als 1 festgelegt wurden und als Mittelwerte \pm S.E.M. (Standardabweichung des Mittelwerts) ausgedrückt (n=4) * $P < 0.05$.

Während der CD95L die gp130-Proteinexpression in Rattenhepatozyten stark herunterreguliert, konnte kein signifikanter Effekt von CD95L auf die gp130-mRNA-Level beobachtet werden (Abbildung 10). So scheint ein posttranskriptioneller Mechanismus für die Downregulation von gp130 durch CD95L ursächlich zu sein.

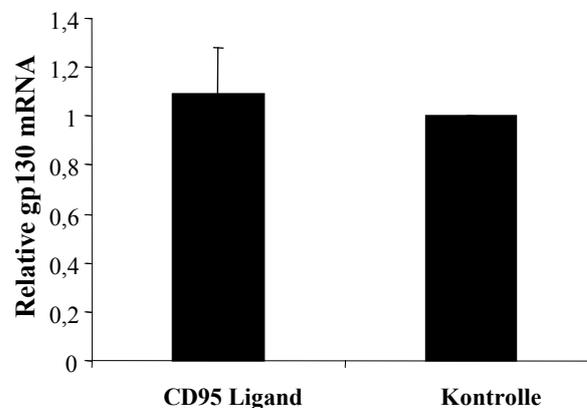


Abbildung 10: Effekt des CD95 Liganden auf die gp130-mRNA

Primäre Rattenhepatozyten wurden ohne (Kontrolle) oder mit CD95 Ligand (100 ng/ml) für eine Stunde inkubiert und die mRNA präpariert. mRNA-Level wurden mit Hilfe der real time PCR analysiert. Hierzu wurden Primer benutzt, die Spezifität für Ratten-gp130-mRNA besitzen (siehe Methodenteil PCR). Als Housekeeping-Gen wurde Ratten-HPRT1 benutzt; semi-quantitative mRNA-Level wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode berechnet. Die Daten wurden in Relation zu den jeweiligen Spiegeln der unstimulierten Kontrollen ausgedrückt, welche als 1 gesetzt wurden.

Auch die Vorinkubation von primären Rattenhepatozyten mit hyperosmolarem Medium (405 mosmol/l), welches eine Caspase 3-Aktivierung hervorruft ohne jedoch eine Apoptose auszulösen (82), ist imstande die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung (Tyr⁷⁰⁵) aufzuheben. Wie in Abbildung 11 dargestellt, führt hyperosmolares Medium (405 mosmol/l) zeitabhängig auch zu einer Herunterregulation der gp130-Proteinexpression.

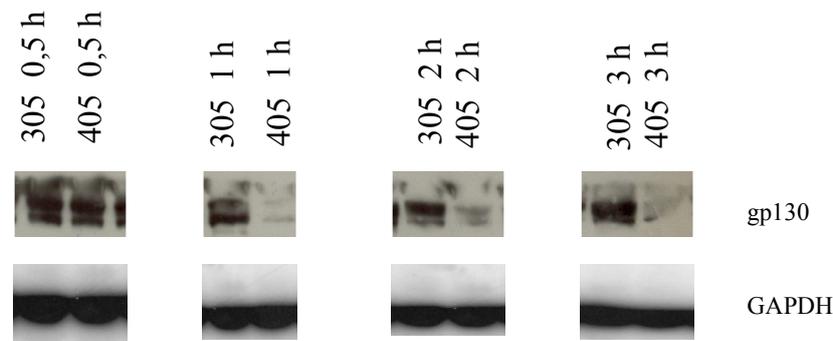


Abbildung 11: Einfluss von Hyperosmolarität auf die basale gp130-Expression

Primäre Rattenhepatozyten wurden unter normoosmotischen (305 mosmol/l) sowie hyperosmotischen (405 mosmol/l) Bedingungen für die angegebenen Zeiträume (30 Minuten bis drei Stunden) kultiviert. 60 μg des Proteins wurden mittels Immunoblot unter Verwendung spezifischer Antikörper auf die gp130- sowie GAPDH-Expression untersucht.

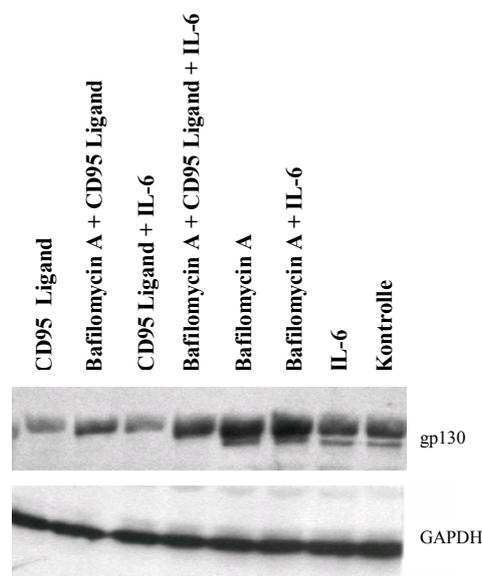
4.1.2 Rolle des Proteasoms bzw. Lysosoms für die CD95L-induzierte gp130-Degradation

CD95L führt zur Herunterregulation der gp130-Untereinheit des IL-6-Rezeptorkomplexes ohne die IL-6-Rezeptoruntereinheit gp80- oder die STAT3-Proteinexpression zu verändern (Abbildungen 7, 9). Die gp130-Rezeptoruntereinheit hat eine Halbwertszeit von 2,5 Stunden (100) und wird normalerweise lysosomal degradiert (8;30). Unter bestimmten experimentellen Bedingungen wurde jedoch auch ein proteasomaler Abbauweg beschrieben

(8). Um die Rolle der lysosomalen Proteolyse für die CD95L-induzierte Herunterregulation des gp130 zu untersuchen, wurde Bafilomycin A (250 nM/l) eingesetzt. Bafilomycin A ist ein Inhibitor der lysosomalen Ansäuerung und blockiert somit die lysosomale Degradation.

In Abbildung 12 ist gezeigt, dass die Expression von gp130 in primären Rattenhepatozyten in Anwesenheit von Bafilomycin A im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gesteigert ist. Dieser Effekt wurde bereits kürzlich beschrieben (32) und spiegelt wahrscheinlich die Inhibition des basalen gp130-Umsatzes wieder, der normalerweise durch eine lysosomale Degradierung hervorgerufen wird. Die CD95L-induzierte Herunterregulation von gp130 bleibt in Rattenhepatozyten verglichen mit den jeweiligen Kontrollen in Gegenwart von Bafilomycin größtenteils erhalten (Abbildung 12). Das bedeutet, dass das Lysosom wahrscheinlich keine Rolle bei der gp130-Degradation durch den CD95L spielt.

A



B

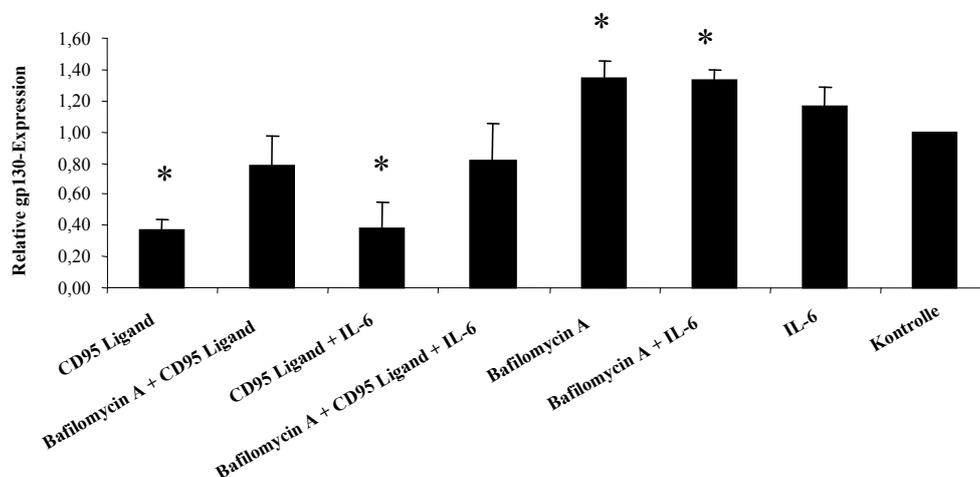


Abbildung 12: Einfluss der Inhibition des Lysosoms auf die Herunterregulation von gp130

(A) 24 Stunden kultivierte primäre Rattenhepatozyten wurden für drei Stunden mit CD95 Ligand (100 ng/ml) inkubiert oder unbehandelt belassen. Wie angegeben wurden die Zellen 30 Minuten vor Inkubation mit dem CD95 Liganden mit Bafilomycin A (250 nM/l) behandelt. Wenn induziert, wurden die Zellen nachfolgend für 20 Minuten mit IL-6 (10 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurden Extrakte des Gesamtproteins verarbeitet; 80 µg des Proteins wurden mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper auf ihre gp130- sowie GAPDH-Expression untersucht.

(B) Mittels Densitometrie wurde die relative gp130-Expression in Hepatozyten gemessen. Die Daten werden in Relation zu den jeweiligen Spiegeln der unstimulierten Kontrollen gesetzt, welche als 1 festgelegt wurden und als Mittelwerte ± S.E.M. (Standardabweichung des Mittelwerts) ausgedrückt (n=4) * P < 0.05.

Die Bedeutung des Proteasoms für die gp130-Degradierung durch CD95L wurde mittels des spezifischen Inhibitors des Proteasoms (MG132) untersucht. Wie Bafilomycin A zeigt MG132 in Hepatozyten keinen Einfluss auf die CD95L-induzierte gp130-Downregulation (Abbildung 13).

Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass der Effekt von CD95L auf die gp130-Proteinexpression nicht durch eine erhöhte lysosomale oder proteasomale Degradierung von gp130 erklärt werden kann.

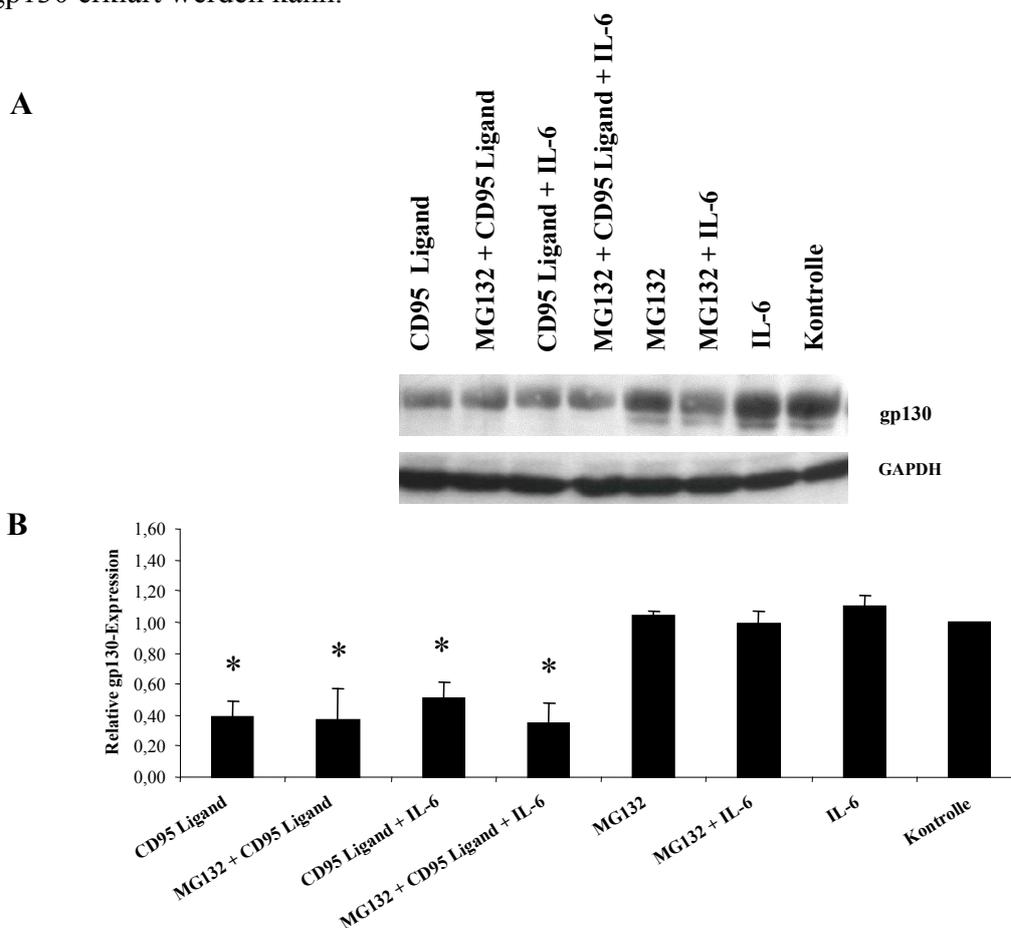


Abbildung 13: Effekt der Inhibition des Proteasoms auf die CD95L-vermittelte Herunterregulation von gp130

(A) Hepatozyten wurden mit CD95 Ligand (100 ng/ml) für drei Stunden inkubiert oder unbehandelt belassen. MG132 (25 μ M/l) wurde, wenn eingesetzt, 30 Minuten vor CD95 Ligand-Inkubation zum Kulturmedium hinzugegeben. Wenn indiziert, wurden die Zellen abschließend für 20 Minuten mit IL-6 (10 ng/ml) stimuliert. Das Gesamtprotein wurde mit Hilfe des Immunoblots auf die Expression von gp130 und GAPDH analysiert.

(B) Mittels Densitometrie wurde die relative gp130-Expression in Hepatozyten gemessen; die Daten wurden in Relation zu den jeweiligen Spiegeln der unstimulierten Kontrollen gesetzt, welche als 1 festgelegt wurden und als Mittelwerte \pm S.E.M. (Standardabweichung des Mittelwerts) ausgedrückt (n=4) * P < 0.05.

4.1.3 Rolle der Caspasen für die CD95L-induzierte gp130-Degradation

CD95L ist ein weithin bekannter Initiator der Apoptose und führt auch zur Aktivierung von Caspasen (55). Die Apoptose zeigt sich unter anderem in einer Spaltung des sog. PARP-Proteins (Poly (ADP-Ribose) Polymerase, 116 kDa), so dass ein sogenanntes PARP-Cleavage-Produkt entsteht, welches nach Behandlung von primären Rattenhepatozyten mit CD95L im Immunoblot zu detektieren ist (Abbildung 14). In Abbildung 14 A ist dargestellt, dass nach Anwendung von Z-DEVD-FMK (50 μ M/l), einem Caspase 3-Inhibitor, die Herunterregulation des gp130 in Anwesenheit von CD95L in primären Rattenhepatozyten annähernd vollständig blockiert ist. Ähnlich verhält sich die gp130-Downregulation nach Inkubation mit Z-IETD-FMK (50 μ M/l), einem Caspase 8-Inhibitor (Abbildung 14 B). Die Degradation von gp130 in Anwesenheit von CD95L kann durch Z-IETD-FMK verhindert werden. Diese Effekte wurden bereits im Rahmen der gp130-Herunterregulation durch Gallensäuren beschrieben (32).

Interessanterweise konnte jedoch auch die CD95L-induzierte Blockade der STAT3-Phosphorylierung (Tyr⁷⁰⁵) in Anwesenheit der Caspase-Inhibitoren wiederhergestellt werden (Abbildung 14 A, B). Dies steht im Kontrast zu den Caspase-Inhibitor-Effekten bei der GCDC-vermittelten Inhibition der IL-6-induzierten STAT3-Aktivierung, da dort die Inhibition der Caspasen lediglich zu einer Wiederherstellung der gp130-Expression führt, ohne Einfluss auf die Inhibition der STAT-Aktivierung zu nehmen (32). So ist es wahrscheinlich, dass gp130 ein Substrat für Caspasen darstellt und die Downregulation von gp130 durch CD95L zur Inhibition der IL6-induzierten STAT3-Aktivierung führt.

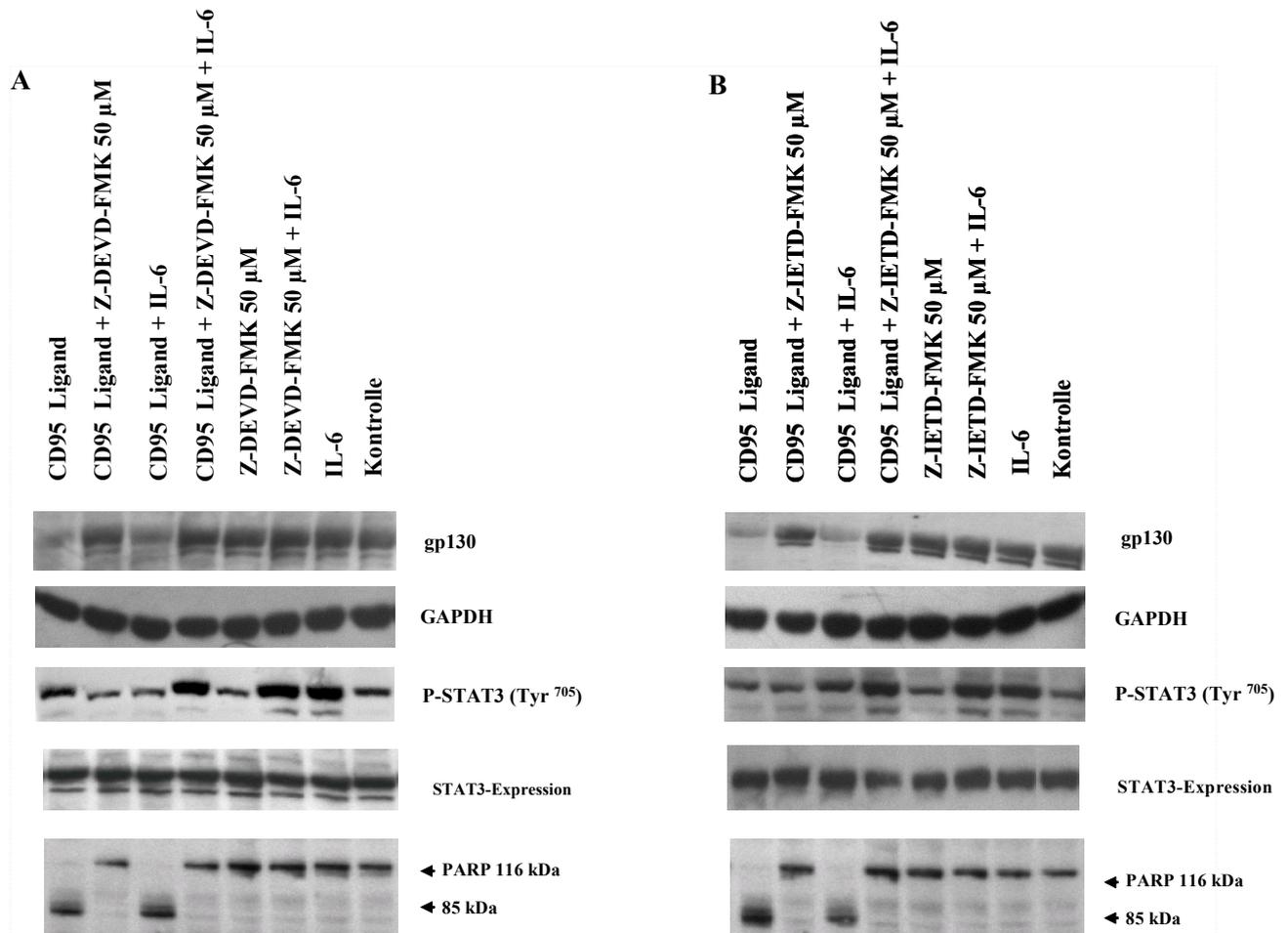


Abbildung 14: Wirkung von Caspase-Inhibitoren auf die gp130-Degradation und die STAT3-Phosphorylierung

80 μ g des Proteins wurden mittels Immunoblot-Analyse auf die gp130-Proteinexpression untersucht, weiterhin wurden die STAT3-⁷⁰⁵Y-Phosphorylierung, die STAT3-Expression, das PARP-Cleavage und die GAPDH mittels spezifischer Antikörper detektiert.

(A) Primäre Rattenhepatozyten wurden mit CD95 Ligand (100 ng/ml) für drei Stunden inkubiert oder unbehandelt belassen, anschließend wurde die Inkubation fortgeführt in An- bzw. Abwesenheit von IL-6 (10 ng/ml für 20 Minuten). Wenn indiziert, wurden die Zellen für 30 Minuten vor Stimulation mit dem CD95-Ligand mit dem Caspase 3-Inhibitor Z-DEVD-FMK (50 μ mol/l) vorbehandelt.

(B) Analog zu den Inkubationszeiten in A wurden die primären Rattenhepatozyten mit dem Caspase 8-Inhibitor Z-IETD-FMK (50 μ M/l) behandelt.

4.2 Inhibition des IFN- α -Signalweges durch Hyperosmolarität

4.2.1 Modulation der IFN- α -induzierten STAT1-Phosphorylierung durch Hyperosmolarität und Gallensäuren

Neben dem Einfluss proapoptotischer Stimuli auf den IL-6-Signalweg wird in dieser Arbeit der Effekt von Hyperosmolarität und Gallensäuren auf den IFN- α -Signalweg auf Ebene von STAT1 (siehe 1.5) untersucht.

Abbildung 15 zeigt die Tyrosinphosphorylierung (Tyr⁷⁰¹) von STAT1 nach Stimulation mit Interferon- α (1000 U/ml) für 20 Minuten und deren Modulation durch hyperosmolares Medium (405 mosmol/l) in HepG2-Zellen. Vorinkubation mit hyperosmolarem Medium hemmt die IFN- α -induzierte STAT1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung zeitabhängig. Eine signifikante Inhibition der STAT1-Phosphorylierung ist nach einer Präinkubationsperiode von mindestens einer Stunde festzustellen, wobei die STAT1-Expression nicht signifikant verändert ist.

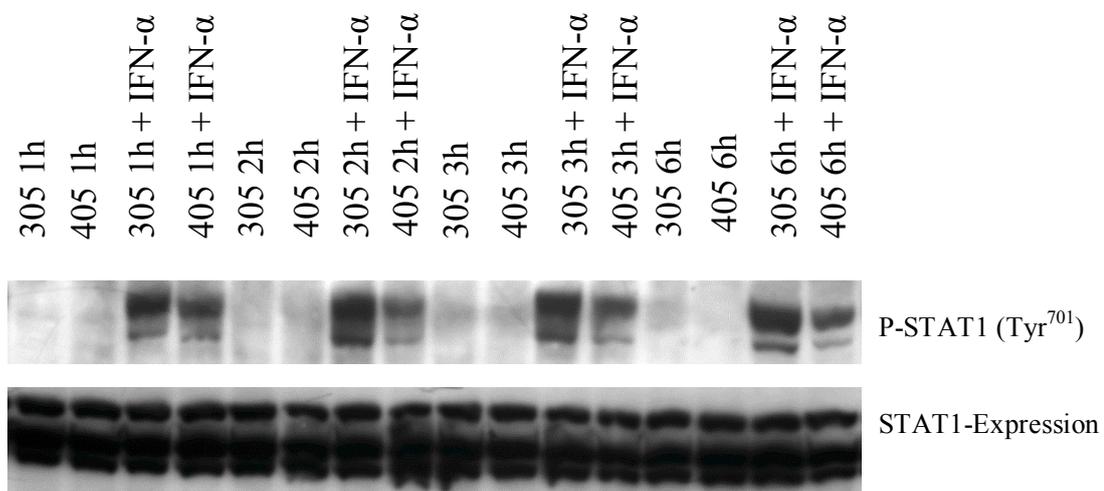


Abbildung 15: Modulation der IFN- α -vermittelten Phosphorylierung von STAT1 durch Hyperosmolarität

HepG2-Zellen wurden mit hyperosmolarem Medium (405 mosmol/l) für die angegebenen Zeitperioden (eine bis sechs Stunden) präinkubiert oder unbehandelt (305 mosmol/l, Kontrolle) belassen. Zum induzierten Zeitpunkt wurde IFN- α (1000 U/ml) für weitere 20 Minuten hinzugegeben.

Anschließend wurden Extrakte des Gesamtproteins verarbeitet. 60 μ g des Proteins wurden mittels Immunoblot-Analyse auf ihre STAT1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung untersucht und es wurde das Gesamt-STAT1-Protein bestimmt. Hierfür wurden Antikörper mit Spezifität gegen STAT1 oder phosphoryliertes STAT1 (Tyr⁷⁰¹) benutzt.

Hyperosmolarität (405 mosmol/l) führt in Hepatozyten zur Aktivierung der Caspase 3 ohne jedoch eine Apoptose auszulösen (82). Auf Grund dessen wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die Inhibition der IFN- α -induzierten STAT1-Phosphorylierung durch Hyperosmolarität über einen Caspase-abhängigen Weg vermittelt wird. Zu diesem Zweck wurden Studien mit Caspaseinhibitoren durchgeführt. Die Präinkubation der HepG2-Zellen mit Z-IETD-FMK (Caspase 3-Inhibitor) bzw. Z-DEVD-FMK (Caspase 8-Inhibitor) blieb jedoch bezüglich einer Wiederherstellung der STAT1-Phosphorylierung ineffektiv (Daten nicht gezeigt).

Analog der Vorinkubation mit hyperosmolarem Medium, welches die IFN- α -induzierte STAT1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung zeitabhängig inhibieren kann, wurde der Einfluss der hydrophoben Gallensäure GCDC auf das IFN- α -Signalling untersucht. GCDC ist wie Hyperosmolarität als ein apoptotisch wirkender Stimulus in der Zelle bekannt.

Abbildung 16 zeigt die Tyrosinphosphorylierung (Tyr⁷⁰¹) von STAT1 nach Stimulation mit IFN- α (1000 U/ml) für 20 Minuten und deren Modulation durch GCDC (100 μ M/l) in HepG2-Zellen, die mit dem NTCP-Plasmid stabil transfeziert wurden. Vorinkubation mit GCDC hemmt die STAT1-Phosphorylierung zeitabhängig. Eine signifikante Inhibition der IFN- α -induzierten STAT1-Phosphorylierung ist nach einer Präinkubationsperiode von mindestens 3 Stunden festzustellen, wobei die STAT1-Expression nicht signifikant verändert ist.

Da GCDC in der Lage ist, im Rahmen der Apoptose eine Aktivierung von Caspasen auszulösen (33;83), wurden Versuche mit Caspaseinhibitoren angeschlossen, um eine Involvierung der Caspasen an der Blockade der STAT1-Phosphorylierung zu untersuchen. Die Präinkubation der NTCP-HepG2-Zellen mit Z-IETD-FMK (einem Caspase 3-Inhibitor) bzw. Z-DEVD-FMK (einem Caspase 8-Inhibitor) kann die STAT1-Phosphorylierung in Anwesenheit von Gallensäuren nicht wiederherstellen (Daten nicht gezeigt).

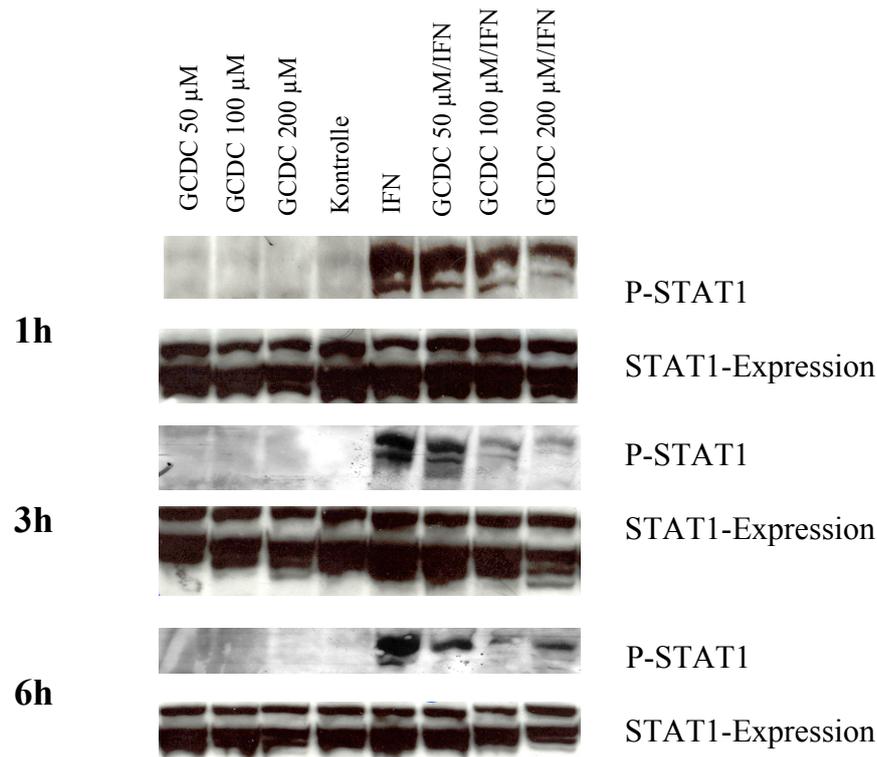


Abbildung 16: Modulation der IFN- α -vermittelten Phosphorylierung von STAT1 (Tyr⁷⁰¹) durch GCDC

NTCP-HepG2-Zellen wurden mit GCDC (100 μ M/l) für die angegebenen Zeit-Perioden (eine bis sechs Stunden) präinkubiert oder uninkubiert (Kontrolle) belassen. Zum indizierten Zeitpunkt wurde IFN- α (1000 U/ml) für weitere 20 Minuten nach der GCDC-Präinkubation hinzugegeben. Anschließend wurden Extrakte des Gesamtproteins verarbeitet. 60 μ g des Proteins wurden mittels Immunoblot-Analyse untersucht auf ihre STAT1-Tyr⁷⁰¹-Phosphorylierung und es wurde das Gesamt-STAT1-Protein-Level bestimmt. Hierfür wurden Antikörper mit Spezifität für STAT1 oder phosphoryliertes STAT1 (Tyrosin⁷⁰¹) benutzt.

4.2.2 Inhibition der IFN- α -induzierten MxA-Expression durch Hyperosmolarität

IFN- α induziert die Transkription von verschiedenen Proteinen wie z.B. PKR (Proteinkinase R), OAS (‘‘2’-5’ oligoadenylate synthetase‘‘) und sog. Mx-Proteine, die unter anderem durch Hemmung der Translation oder Induktion der Apoptose von Virus-infizierten Zellen antiviral wirken (37;75;87).

Abbildung 17 zeigt, dass Hyperosmolarität die IFN- α -induzierte MxA-Expression blockiert und so möglicherweise eine Interferonresistenz bedingt.

In der Abbildung ist weiterhin dargestellt, wie verschiedene Osmolyte die MxA-Expression in Anwesenheit von hyperosmolarem Medium (405 mosmol/l) modulieren.

Betain, als hepatoprotektiv wirkendes Osmolyt, hebt die Inhibition der IFN- α -induzierten MxA-Expression durch Hyperosmolarität auf, während Taurin keinen Effekt diesbezüglich besitzt (Abbildung 17).

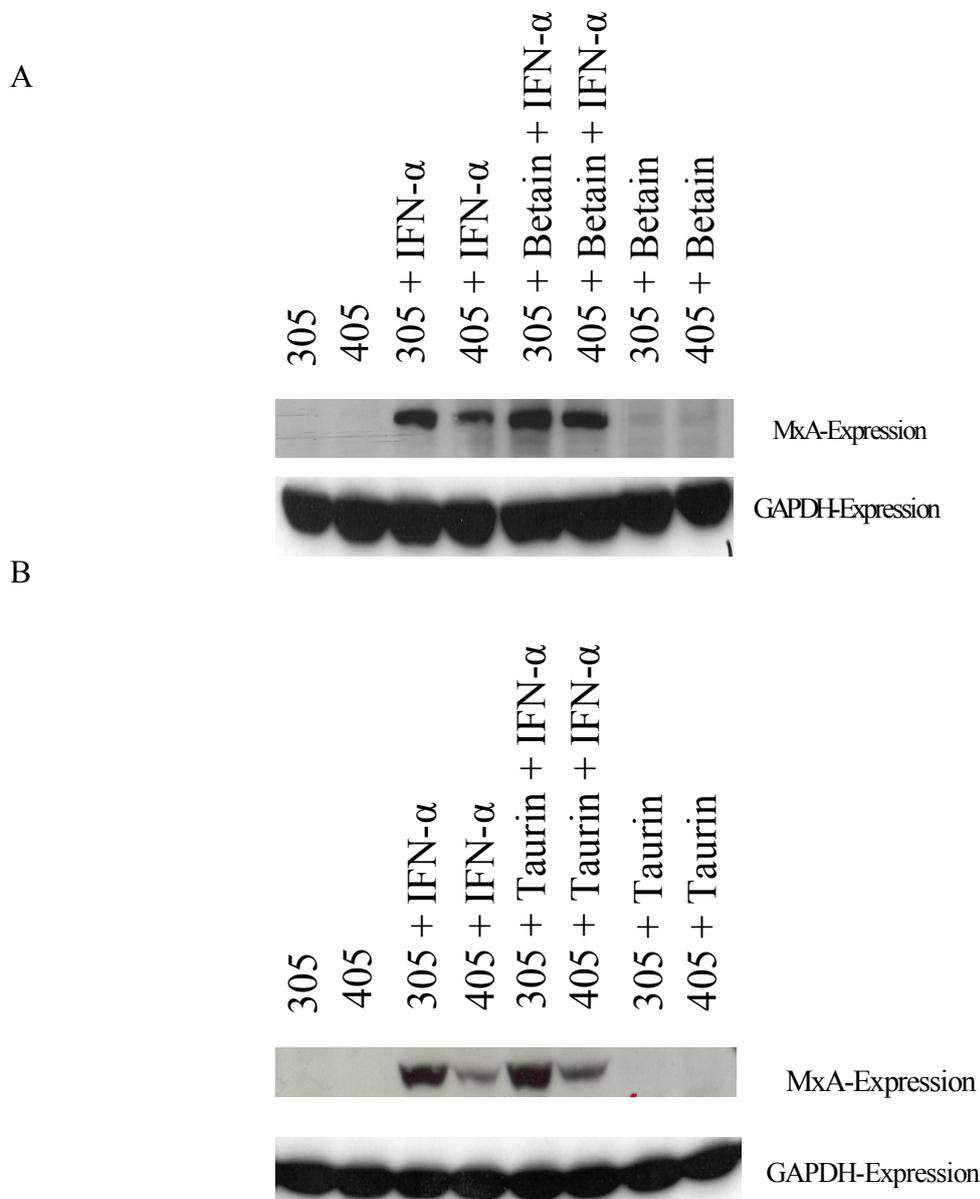


Abbildung 17: Wirkung von Betain und Taurin auf die Herunterregulation von MxA

60 μ g des Proteins wurden mittels Immunoblot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers auf ihre MxA-Expression untersucht. GAPDH diente als Beladungskontrolle und wurde ebenfalls mittels eines spezifischen Antikörpers bestimmt.

HepG2-Zellen wurden mit hyperosmolarem Medium (405 mosmol/l) für sechs Stunden inkubiert oder unbehandelt belassen (305 mosmol/l), anschließend wurde die Inkubation in An- bzw. Abwesenheit von IFN- α (1000 U/ml) für 20 Minuten fortgesetzt.

Wenn eingesetzt, wurden die Zellen für 14 Stunden vor Stimulation mit hyperosmolarem Medium mit Betain (5 mM/l) (17A) oder Taurin (5 mM/l) (17B) vorbehandelt.

5. Diskussion

5.1 Modulation des IL-6-Signalweges durch den CD95 Liganden und Hyperosmolarität

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der CD95L die IL-6-induzierte STAT3-Tyrosin⁷⁰⁵-Phosphorylierung in primären Ratten-Hepatozyten zeitabhängig inhibiert. Weiterhin führt CD95L zur Abnahme der gp130-Proteinexpression in primären Rattenhepatozyten, wie es auch für apoptotische Gallensäuren beschrieben wurde (32). Da die gp130-mRNA-Spiegel in Hepatozyten durch CD95L unbeeinflusst blieben, ist ein vermehrter Abbau des gp130-Proteins wahrscheinlich.

Normalerweise wird gp130 lysosomal degradiert, aber unter bestimmten experimentellen Bedingungen wurde auch ein proteasomaler Abbau beschrieben (8;30). Die Rolle dieser physiologischen Abbauewege für die CD95L-induzierte Expressionsabnahme von gp130 wurde mittels spezifischer Inhibitoren untersucht. Pharmakologische Inhibition der lysosomalen Degradierung durch Bafilomycin A einerseits oder der proteasomalen Degradierung durch MG132 andererseits verhinderte nicht die CD95L-induzierte Abnahme der gp130-Proteinexpression in Hepatozyten. So scheinen diese beiden Abbaumechanismen nicht ursächlich für die CD95L-induzierte gp130-Degradation zu sein.

Hingegen konnte der Nachweis erbracht werden, dass die gp130-Protein-Degradation durch CD95L vermutlich Caspase-abhängig mediiert wird. Diese Hypothese konnte durch folgende Beobachtungen gestützt werden:

(a) Abgesehen von CD95L induzieren auch weitere Caspase-aktivierende Stimuli wie hyperosmotischer Stress (eigene Daten) oder die Apoptose auslösende Gallensäure GCDC eine gp130-Degradation (32).

(b) Die CD95L-induzierte gp130-Downregulation konnte in Hepatozyten durch Caspase-Inhibitoren aufgehoben werden. Z-DEVD-FMK, als Inhibitor der Caspase 3, und Z-IETD-FMK, als Inhibitor der Caspase 8, können die Degradation von gp130 fast komplett blockieren.

Voraussetzung für die Phosphorylierung/Aktivierung der STAT-Moleküle bzw. der Tyrosinphosphatase SHP2 nach IL-6-Stimulation ist ihre transiente Assoziation mit spezifischen durch Jaks phosphorylierten Tyrosinresten des gp130. Die Interaktion der SH2-

Domänen mit den phosphorylierten Tyrosinresten des gp130-Moleküls findet im Fall von STAT an den intrazytoplasmatisch distal gelegenen Tyrosinresten 767, 814, 905 und 915 statt, während die SHP2 an den weiter proximal gelegenen Tyrosinrest 759 bindet.

Caspasen repräsentieren eine Familie von Cystein-Proteasen, die ein vier Aminosäuren beinhaltendes Motiv ihres entsprechenden Liganden erkennen, nämlich P4-P3-P2-P1. In der Regel finden sich die Caspase-Schnittstellen nach dem C-terminalen Rest (P1), der für gewöhnlich ein Aspartat ist (31). Die nun an der CD95L-induzierten gp130-Degradation als beteiligt vermutete Caspase 3 spaltet ihr Substrat an einem Aspartat-Rest in Position 1 des Abbaumotives und ihr präferiertes Schnittmotiv stellt die Aminosäuresequenz DXXD (D-Aspartat, X-variabel) dar. Im zytoplasmatischen Anteil des humanen, murinen und Rattengp130 finden sich zwei überlappende DXXD-Motive (Position 800-806, human; siehe Abbildung 18). Folglich ist es gut vorstellbar, dass via Caspase 3 ein Cleavage im Bereich dieses Schnittmotivs resultieren könnte. Spaltung des Rezeptors an dieser Stelle würde zu Entstehung eines aus 125 Aminosäuren bestehenden Fragmentes am C-terminalen Ende des gp130 führen.

Interessanterweise würde das Cleavage des gp130 an diese Motive in einem Rezeptor resultieren, dem die drei distalen Tyrosin-Motive (Tyr⁸¹⁴, Tyr⁹⁰⁵, Tyr⁹¹⁵) fehlen. Diese sind relevant für die Rekrutierung und die darauffolgende Aktivierung der STATs (7;43), während das weiter proximal gelegene Tyrosin-Motiv 759 essentiell für die Rekrutierung der Tyrosinphosphatase SHP2 zum gp130 ist, welche letztlich als Voraussetzung für die Tyrosinphosphorylierung (Tyr⁵⁸⁰) der SHP2 gilt. Es scheint wahrscheinlich, dass der übriggebliebene Teil des Rezeptors (der trunkierte Rezeptor) funktionell inaktiv ist, da die IL-6-induzierte SHP2-Phosphorylierung am Tyr⁵⁸⁰ ebenfalls durch den CD95L gehemmt ist (36).



Abbildung 18: gp130-Schnittmotiv der Caspase 3

Schematisches Diagramm des chimären gp130-Rezeptors. Das potentielle, überlappende Cleavage-Motiv der Caspase 3 (DXXDXXD) ist am Rezeptor gekennzeichnet. Es ist vorhanden im gp130 des Menschen, der Ratte und der Maus.

In Einklang mit der Rolle der Caspasen bei der Induktion der gp130-Degradierung stehen die Erkenntnisse, dass in Multiplen Myelom-Zelllinien die Inhibition des Proteasoms in einem Pan-Caspase-sensitiven Abfall des gp130 und der Inhibition der STAT3-Aktivierung resultiert (45).

Die Aktivierung von Caspasen spielt neben der Ausführung ihrer klassischen Funktion als Induktoren des apoptotischen Zelltodes eine wichtige Rolle bei anderen zellulären, nicht-apoptotischen Prozessen wie Inflammation, T-Zell-Proliferation, Regulation des Zellzyklus, Zell-Differenzierung sowie der Aktivierung von NF- κ B (2;60;96). Ein Caspase-abhängiges Cleavage konnte für verschiedene Gruppen von Molekülen gezeigt werden, z.B. für Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, STAT1, CREB [CRE-bindendes Protein]), Zellzyklus-regulatorische Proteine (Cyklone, Retinoblastom-Protein), in die Signaltransduktion involvierte Kinasen (PKB, PKC, MEK) oder Proteine, die am Aufbau von zytoplasmatischen (Aktin, Vimentin) oder nukleären Proteinen (Nukleoporine) sowie DNA-Reparatur, -synthese und -cleavage (PARP [Poly(ADP-Ribose)-Polymerase], Topoisomerasen) beteiligt sind (27). In letzter Zeit wurden zunehmend auch verschiedene Plasmamembran-Rezeptoren als Substrate von Caspasen identifiziert (27;31;32). Caspasen nehmen insofern Einfluss auf die Signaltransduktion der Zelle, als dass das Cleavage der Rezeptoren die Aktivierung ihres Liganden-induzierten intrazellulären Signallings blockiert. Diese Studie zeigt, dass dies auch für gp130 gilt, welches ein essentielles Signalelement vieler Zytokine darstellt. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Caspasen neben ihrer Rolle in der Apoptose auch zur Induktion der zellulären Resistenz gegenüber multiplen Zytokinen führen können. Dass sich eine Caspasen-Aktivierung auch ohne Auslösung einer Apoptose, z.B. als Reaktion auf milden hyperosmotischen Stress ereignen kann, unterstützt eine Caspasenbeteiligung bei nicht-apoptotischen Zellfunktionen wie der hier untersuchten Modulation des IL-6-Signalweges (32;82). Da die Inhibition der STAT3-Phosphorylierung im Zeitverlauf annähernd parallel mit der Verminderung des gp130-Proteinspiegels verlief, wurde mittels Caspase-Inhibitoren die Rolle der Caspasen für die Wirkung von CD95L auf der STAT3-Ebene untersucht. Die Inhibition der gp130-Downregulation in Hepatozyten durch Caspase-Inhibitoren stellte die IL-6-vermittelte STAT3-Aktivierung in Gegenwart von CD95L wieder her. Dies lässt darauf schließen, dass die Herunterregulation des gp130 in Anwesenheit von CD95L ursächlich für die Inhibition des IL-6-Signallings auf Ebene der STAT3-Phosphorylierung zu sein scheint. Diese Erkenntnisse stehen im Gegensatz zu der Wirkung von hydrophoben Gallensäuren wie GCDC auf das IL-6-Signalling. Im Fall von GCDC kann die gp130-Proteinexpression durch Inhibition der Caspasen 3 und 8 wiederhergestellt werden,

während die Inhibition der STAT3-Phosphorylierung unbeeinflusst bleibt (32). Bei der Inhibition der IL-6-vermittelten STAT3-Aktivierung durch GCDC existieren demzufolge weitere Signalwege, die inhibierend auf der Ebene von STAT wirken. So konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der IL-6-induzierten STAT3-Aktivierung in Anwesenheit von GCDC in Rattenhepatozyten zumindest teilweise wiederaufgehoben werden konnte, indem die p38^{MAPK} gehemmt wurde, ohne hierdurch Einfluss auf die gp130-Proteinlevel zu nehmen. Dies lässt eine Mitwirkung der p38^{MAPK} an der GCDC-induzierten Inhibition der STAT3-Phosphorylierung unabhängig von dem Abfall des gp130-Proteins vermuten (32).

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

Die essentielle Rolle von IL-6 für die hepatische Homöostase im Rahmen von Leberschädigungen verdeutlichen Studien mit IL-6-Knockout-Tieren, da diese eine erhöhte Sensitivität für hepatotoxische Reize wie z.B. Endotoxine zeigen (23;54;98). Die Rolle von IL-6 für die Leber-Regeneration hingegen wird kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite gilt IL-6 als positiver Auslöser der Hepatozyten-Proliferation. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass nach partieller Hepatektomie die Leberregeneration in IL-6-defizienten Tieren stark vermindert ist (20). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass IL-6 nach partieller Hepatektomie protektive Signalwege induziert, ohne einen signifikanten Einfluss auf die Hepatozyten-Proliferation zu nehmen. Überstimulation mit IL-6 führte sogar zu Inhibition der Hepatozyten-Proliferation (9). Weiterhin wurde beschrieben, dass sich IL-6-Knockout-Tiere, im Vergleich zu Wild-Typ-Mäusen, 12 Wochen nach Gallengangsligation in einem fortgeschritteneren Stadium der biliären Fibrose befinden, welches mit höheren Serum-Bilirubin-Spiegeln sowie erhöhter Mortalität assoziiert ist (23). Auch gp130-Knockout-Tiere zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber toxischen Einflüssen und eine erhöhte Mortalität während cholestatischer Syndrome.

Dies legt die wichtige Rolle der gp130/Jak/STAT-Signalkaskade für die protektive Wirkung von IL-6 im Rahmen von Lebererkrankungen dar (103;104;113). Neben TNF- α , Ethanol und

Gallensäuren besitzen, wie in dieser Studie gezeigt, CD95L und hyperosmotischer Stress eine IL-6-antagonistische Wirkung.

Es ist gut dokumentiert, dass die STAT3-Aktivierung einen Mediator für Signale darstellt, die essentiell sind für die zelluläre Proliferation und das zelluläre Überleben. STAT3 aktiviert verschiedene Gene, die in der Kontrolle des Zellzyklus involviert sind, wie z.B. die Cycline D1, D2 und D3. Weiterhin werden durch STAT3 Gene aktiviert, die antiapoptotisch wirken, wie c-myc, bcl-x1 oder bcl (47;78). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Aktivierung der Caspase 3 während verschiedener Lebererkrankungen unabhängig von den zur Caspasen-Aktivierung führenden Mechanismen eine Hepatotoxizität nicht nur durch Induktion der Hepatozyten-Apoptose bewirkt (31;80;102), sondern auch die Downregulation antiapoptotischer Signale durch STAT3-Inhibition umfasst.

Apoptose spielt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie verschiedenster Lebererkrankungen (90). Der klassische Aktivator der Hepatozyten-Apoptose ist CD95L. So zeigen Patienten mit NASH (nicht-alkoholischer Steatohepatitis) eine vermehrte Hepatozyten-Apoptose und CD95-Expression, welche mit der Erkrankungs-Schwere korreliert (26). Die CD95-vermittelte hepatozelluläre Apoptose ist ebenso involviert bei der Leberschädigung durch Ethanolkonsum (74). Weiterhin ist die Caspase 3 in Serum-Proben von Patienten messbar, die mit dem Hepatitis C-Virus infiziert sind, wobei die Serumlevel mit der Schwere der Erkrankung korrelieren (6). So erscheint es wahrscheinlich, dass eine Aktivierung von Caspasen die hepatoprotektiven IL-6-Effekte modulieren kann und so zur Hepatoxizität beiträgt.

Zusammenfassend zeigen wir in dieser Arbeit, dass der CD95L die IL-6-vermittelte Signaltransduktion durch einen Abbau von gp130 inhibieren kann und so zur Blockade der STAT3-Phosphorylierung führt. Der Caspase 3-vermittelte Abbau von gp130 spielt möglicherweise eine wichtige Rolle bei den hepatotoxischen Effekten von apoptotischen Stimuli, indem die protektiven Effekte von IL-6 auf die Leber-Regeneration oder Akut-Phase-Antwort antagonisiert werden.

5.2 Modulation des IFN- α -Signalweges durch Gallensäuren und Hyperosmolarität

Interferone gehören zu einer großen Familie pleiotroper Zytokine, die im Rahmen eines viralen Infektes induziert und sezerniert werden, um eine zelluläre, antivirale Antwort auszulösen. Zudem wirken sie immunmodulatorisch und antiproliferativ (87) und werden als Standardtherapie bei Patienten mit chronischer Hepatitis C-Infektion eingesetzt (28). Die Infektion mit dem Hepatitis C-Virus wurde als eine der Hauptursachen für die Pathogenese von chronischen Hepatitiden, der Leberzirrhose und dem hepatozellulärem Karzinom identifiziert (3).

Die Ansprechraten der Interferontherapie im Rahmen einer chronischen Hepatitis C mit dem Genotyp 1 liegen jedoch nur bei 50-60 % (28). Verschiedene Wirts- und Virusabhängige Faktoren bedingen diese Resistenz gegenüber IFN- α im Rahmen einer chronischen Hepatitis C-Infektion (11;97;116).

Auch hydrophobe Gallensäuren können das Therapieansprechen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C-Infektion beeinflussen, insofern als dass erhöhte Gallensäureserumspiegel mit einer verminderten Ansprechrate gegenüber der Hepatitis C-Standardtherapie mit IFN- α einhergehen (97). Ein weiterer Punkt, der eine IFN- α -antagonistische Wirkung von Gallensäuren vermuten lässt, ist die klinische Beobachtung, dass auch bei Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose die Effizienz der IFN- α -Therapie deutlich herabgesetzt ist (116). Bei diesen finden sich deutlich erhöhte Gallensäurespiegel im Serum, so dass eine Modulation der IFN- α -induzierten antiviralen Antwort durch Gallensäuren prinzipiell möglich erscheint. Podevin et al. zeigen diesbezüglich in Zellkultur, dass in Anwesenheit von hydrophoben Gallensäuren die Expression von IFN- α -induzierten antiviralen Proteinen wie MxA vermindert ist (76).

Wir haben in dieser Arbeit den Effekt von hydrophoben Gallensäuren und hyperosmotischem Stress auf die IFN- α -induzierte STAT1-Phosphorylierung untersucht. Unter beiden Bedingungen kann die IFN- α -vermittelte STAT1-Phosphorylierung blockiert werden. Dies könnte eine Mitursache für die verminderte Effizienz der IFN- α -Therapie bei HCV-infizierten Patienten mit erhöhten Gallensäurespiegeln sein. Wir zeigen weiterhin die inhibitorische Wirkung von hyperosmotischem Stress auf die IFN- α -induzierte MxA-Expression. Bereits milde Hypernatriämien gehen mit einem Anstieg der Serumosmolarität einher und könnten so Einfluss auf die antivirale IFN- α -Antwort nehmen.

Einer Verbesserung des Therapieansprechens durch Aufhebung der Resistenz gegenüber IFN ist von besonderem klinischem Interesse. Betain, ein natürliches Stoffwechselprodukt von Cholin, stellt hierbei eine interessante Substanz dar. Eine Cholin-defiziente Ernährung führt im Tierversuch zur Entwicklung einer Steatohepatitis. Bei Patienten mit nichtalkoholischer Steatohepatitis (NASH) wird Betain im Hinblick auf die Inhibition der hepatischen Entzündungsaktivität und die Rückbildung der Steatose bereits erfolgreich eingesetzt (1;115). Es konnte auf experimenteller Ebene gezeigt werden, dass Betain in der Lage ist eine Apoptoseinduktion in Anwesenheit von Gallensäuren zu inhibieren (34). Weiterhin kann eine durch den Hepatitis C-Virus selbst vermittelte Inhibition der IFN-induzierten antiviralen Wirkung durch Betain rückgängig gemacht werden (22).

Es zeigte sich nun in dieser Arbeit, dass eine Präinkubation von HepG2-Zellen mit Betain die Inhibition der IFN- α -induzierten MxA-Expression durch Hyperosmolarität verhindern kann, während Taurin diesbezüglich keinen Effekt besitzt. Betain besitzt drei wesentliche zelluläre Wirkungen: So kann es als Osmolyt wirken, als Chaperon proteinstabilisierende Wirkung vermitteln (107) oder als Methylgruppen-Donor zelluläre Funktionen modulieren (17). Der genaue zugrundeliegende Wirkmechanismus des Betains bezüglich des beobachteten Effektes auf die Wiederherstellung der MxA-Expression unter hyperosmolarem Stress ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Eine Modulation des IFN- α -Signallings durch apoptotische Stimuli könnte auch auf der Ebene des IFN- α -Rezeptors erfolgen. Analog dem gp130 beim IL-6-Signalweg könnte der IFN- α -Rezeptor gespalten werden und so zur Inhibition des IFN- α -Signalweges führen. Die in dieser Arbeit bei der CD95L-induzierten gp130-Degradation als beteiligt identifizierte Caspase 3 ist auch bei der Inhibition des IFN-Signalweges von besonderem Interesse. Interessanterweise besitzt der IFNAR2-Rezeptor im Gegensatz zu dem IFNAR1-Rezeptor mehrere potentielle intrazytoplasmatische Caspase 3-Cleavage-Motive, so dass ein Caspase-vermitteltes Cleavage des IFNAR2 potentiell möglich erscheint. Es konnte gezeigt werden, dass die Tyrosine in Position 337 und 512 des IFNAR2 essentiell für die IFN- α -vermittelte STAT-Aktivierung und antiproliferative Wirkung sind (111). Somit hätte ein Caspase-vermitteltes Cleavage des IFNAR2 Einfluss auf die IFN- α -abhängige Signaltransduktion. In unserer Untersuchung allerdings kann durch Caspase 3/8-Inhibitoren die Blockade der STAT1-Phosphorylierung durch Hyperosmolarität nicht wiederhergestellt werden.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Effekt von proapoptischen Stimuli wie CD95L, der Gallensäure GCDC und Hyperosmolarität auf hepatoprotektive Signalwege von IL-6 und IFN- α untersucht.

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin mit pro- sowie anti-inflammatorischen Eigenschaften. Es schützt vor Leberschäden durch Ethanol oder CCL₄ und vermittelt günstige Effekte in Ischämie/Reperfusion-Modellen sowie bei anderen chronischen Leberkrankheiten wie einer obstruktiven Cholestase. Im Rahmen cholestatischer Syndrome finden sich erhöhte IL-6-Serumspiegel bei den Patienten und man postuliert einen hepatoprotektiven Effekt durch dieses Zytokin.

Interferone (IFN) stellen eine große Familie pleiotroper Zytokine dar, die im Rahmen eines viralen Infektes induziert und sezerniert werden, um eine zelluläre antivirale Antwort auszulösen. Es folgt die Transkription von verschiedenen antiviralen Proteinen wie z.B. PKR (Proteinkinase R), OAS ("2'-5' oligoadenylate synthetase") und sog. Mx-Proteinen, daneben vermittelt IFN- α antiproliferative und immunmodulatorische Wirkungen. Interferone werden als Standardtherapie bei chronischer Hepatitis C eingesetzt.

In dieser Arbeit dienen primäre Rattenhepatozyten und HepG2-Zellen als Modell, eine IL-6- und IFN- α -antagonistische Wirkung von CD95L, hyperosmotischem Stress und hydrophoben Gallensäuren zu zeigen.

Der Einfluss der beiden proapoptischen Stimuli CD95L sowie Hyperosmolarität auf die IL-6-vermittelte Signaltransduktion wurde auf zwei Ebenen der Signaltransduktion analysiert, der Rezeptorebene und der Ebene der Aktivierung von STAT3.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CD95L und Hyperosmolarität eine Abnahme der Expression der signaltransduzierenden Untereinheit des IL-6-Rezeptorkomplexes gp130 sowie der STAT3-Phosphorylierung vermitteln.

Unsere Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass der Effekt von CD95L auf die gp130-Proteinspiegel nicht durch eine erhöhte lysosomale oder proteasomale Degradierung von gp130 erklärt werden kann. So ist es hingegen wahrscheinlich, dass gp130 ein Substrat für Caspasen darstellt und die Downregulation von gp130 in Anwesenheit von CD95L zur Inhibition der IL-6-induzierten STAT3-Aktivierung führt.

Hyperosmotischer Stress und hydrophobe Gallensäuren sind in HepG2-Zellen in der Lage die IFN- α -induzierte STAT1-Phosphorylierung zu inhibieren. Auch die IFN- α -vermittelte

Expression des antiviralen Proteins MxA wird durch Hyperosmolarität vermindert. Betain als hepatoprotektiv wirkendes Osmolyt kann die Inhibition der IFN- α -induzierten MxA-Expression durch Hyperosmolarität aufheben, Taurin hingegen nicht.

Die Daten zeigen, dass proapoptische Einflüsse wie der Ligand des Todesrezeptors CD95, hyperosmotischer Stress und hydrophobe Gallensäuren das IL-6- sowie das IFN- α -Signalling auf verschiedenen Ebenen inhibieren können.

Neben der klassischen Induktion der Apoptose können die oben genannten Stimuli somit hepatoprotektive Signalwege abschalten, die unter anderem Überlebenssignale und eine antivirale Wirkung vermitteln.

Die Identifikation von Substanzen, die eine Interferon-Resistenz aufheben, ist von besonderem klinischen Interesse. Hier stellt Betain aufgrund seines geringen Nebenwirkungsprofils eine interessante Substanz dar.

Literaturverzeichnis

1. Abdelmalek MF, Angulo P, Jorgensen RA, Sylvestre PB, Lindor KD. Betaine, a promising new agent for patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Am J Gastroenterol* 96: 2711-2717, 2001.
2. Alam A, Cohen LY, Aouad S, Sekaly RP. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med* 190: 1879-1890, 1999.
3. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 26: 62-65, 1997.
4. Auernhammer CJ, Bousquet C, Chesnokova V, Melmed S. SOCS proteins: modulators of neuroimmunoendocrine functions. Impact on corticotroph LIF signaling. *Ann N Y Acad Sci* 917: 658-664, 2000.
5. Bae SS, Choi JH, Oh YS, Perry DK, Ryu SH, Suh PG. Proteolytic cleavage of epidermal growth factor receptor by caspases. *FEBS Lett* 491: 16-20, 2001.
6. Bantel H, Lügering A, Poremba C, Lügering N, Held J, Domschke W, Schulze-Osthoff K. Caspase activation correlates with the degree of inflammatory liver injury in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 34: 758-767, 2001.
7. Barton BE. The biological effects of interleukin 6. *Med Res Rev* 16: 87-109, 1996.
8. Blanchard F, Wang Y, Kinzie E, Duplomb L, Godard A, Baumann H. Oncostatin M regulates the synthesis and turnover of gp130, leukemia inhibitory factor receptor alpha, and oncostatin M receptor beta by distinct mechanisms. *J Biol Chem* 276: 47038-47045, 2001.
9. Blindenbacher A, Wang X, Langer I, Savino R, Terracciano L, Heim MH. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 38: 674-682, 2003.
10. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15: 725-731, 2003.
11. Bode JG, Brenndörfer ED, Häussinger D. Subversion of innate host antiviral strategies by the hepatitis C virus. *Arch Biochem Biophys* 462: 254-265, 2007.
12. Bode JG, Nimmesgern A, Schmitz J, Schaper F, Schmitt M, Frisch W, Häussinger D, Heinrich PC, Graeve L. LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages. *FEBS Lett* 463: 365-370, 1999.

13. Bode JG, Schweigart J, Kehrmann J, Ehling C, Schaper F, Heinrich PC, Häussinger D. 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* 171: 257-266, 2003.
14. Borgstrom B. Bile salts--their physiological functions in the gastrointestinal tract. *Acta Med Scand* 196: 1-10, 1974.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
16. Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S. Receptors that mediate cellular dependence. *Cell Death Differ* 12: 1031-1043, 2005.
17. Chamberlin ME, Strange K. Anisoosmotic cell volume regulation: a comparative view. *Am J Physiol* 257: 159-173, 1989.
18. Chen J, Kunos G, Gao B. Ethanol rapidly inhibits IL-6-activated STAT3 and C/EBP mRNA expression in freshly isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett* 457: 162-168, 1999.
19. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 7: 313-319, 2002.
20. Cressman DE, Greenbaum LE, De Angilis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 274: 1379-1383, 1996.
21. Degtarev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene* 22: 8543-8567, 2003.
22. Duong FH, Christen V, Filipowicz M, Heim MH. S-Adenosylmethionine and betaine correct hepatitis C virus induced inhibition of interferon signaling in vitro. *Hepatology* 43: 796-806, 2006.
23. Ezure T, Sakamoto T, Tsuji H, Lunz JG 3rd, Murase N, Fung JJ, Demetris AJ. The development and compensation of biliary cirrhosis in interleukin-6-deficient mice. *Am J Pathol* 156: 1627-1639, 2000.
24. 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* 101: 890-898, 1998.
25. Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, Kaufmann SH, Gores GJ. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* 103: 137-145, 1999.

26. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniguchi M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 125: 437-443, 2003.
27. Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10: 76-100, 2003.
28. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncalves FL Jr, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347: 975-982, 2002.
29. Fu XY, Kessler DS, Veals SA, Levy DE, Darnell JE Jr. ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8555-8559, 1990.
30. Graeve L, Korolenko TA, Hemmann U, Weiergräber O, Dittrich E, Heinrich PC. A complex of the soluble interleukin-6 receptor and interleukin-6 is internalized via the signal transducer gp130. *FEBS Lett* 399 : 131-134, 1996.
31. Graf D, Bode JG, Häussinger D. Caspases and receptor cleavage. *Arch Biochem Biophys* 462: 162-170. 2007.
32. Graf D, Kohlmann C, Haselow K, Gehrmann T, Bode JG, Häussinger D. Bile acids inhibit interleukin-6 signaling via gp130 receptor-dependent and -independent pathways in rat liver. *Hepatology* 44: 1206-1217, 2006.
33. 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* 112: 1411-1427, 2002.
34. Graf D, Kurz AK, Reinehr R, Fischer R, Kircheis G, Häussinger D. Prevention of bile acid-induced apoptosis by betaine in rat liver. *Hepatology* 36: 829-839, 2002.
35. Graf D, Reinehr R, Kurz AK, Fischer R, Häussinger D. Inhibition of taurolithocholate 3-sulfate-induced apoptosis by cyclic AMP in rat hepatocytes involves protein kinase A-dependent and -independent mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 415: 34-42, 2003.
36. 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* 477: 1000-1016, 2008.
37. Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 81: 2341-2364, 2000.

38. Haller O, Kochs G. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* 3: 710-717, 2002.
39. Häussinger D, Kubitz R, Reinehr R, Bode JG, Schliess F. Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology. *Mol Aspects Med* 25: 221-360, 2004.
40. Häussinger D, Kurz AK, Wettstein M, Graf D, Vom Dahl S, Schliess F. Involvement of integrins and Src in tauroursodeoxycholate-induced and swelling-induced choleresis. *Gastroenterology* 124: 1476-1487, 2003.
41. Häussinger D, Saha N, Hallbrucker C, Lang F, Gerok W. Involvement of microtubules in the swelling-induced stimulation of transcellular taurocholate transport in perfused rat liver. *Biochem J* 291: 355-360, 1993.
42. Haspel RL, Salditt-Georgieff M, Darnell JE Jr. The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated STAT1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *EMBO J* 15: 6262-6268, 1996.
43. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374: 1-20, 2003.
44. Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334: 297-314, 1998.
45. Hideshima T, Chauhan D, Hayashi T, Akiyama M, Mitsiades N, Mitsiades C, Podar K, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC. Proteasome inhibitor PS-341 abrogates IL-6 triggered signaling cascades via caspase-dependent downregulation of gp130 in multiple myeloma. *Oncogene* 22: 8386-8393, 2003.
46. Higuchi H, Gores GJ. Bile acid regulation of hepatic physiology: IV. Bile acids and death receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: 734-738, 2003.
47. 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* 19: 2548-2556, 2000.
48. Houten SM, Watanabe M, Auwerx J. Endocrine functions of bile acids. *EMBO J* 25: 1419-1425, 2006.
49. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacrose R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacrose S, Simone S, Bucci R, Farber E. Cell death: apoptosis versus necrosis. *Int J Oncol* 21: 165-170, 2002.

50. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972.
51. Kim TK, Maniatis T. Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273: 1717-1719, 1996.
52. Kimura F, Miyazaki M, Suwa T, Sugiura T, Shinoda T, Itoh H, Ambiru S, Shimizu H, Nakagawa K. Serum interleukin-6 levels in patients with biliary obstruction. *Hepatogastroenterology* 46: 1613-1617, 1999.
53. Kong F, Guo X, Noel JG, Wells DA, Lovell GJ, Ogle CK. Thermal injury-induced increases of hepatocyte SOCS3 lead to decreases in STAT3. *Shock* 18: 374-379, 2002.
54. Kovalovich K, De Angelis RA, Li W, Furth EE, Ciliberto G, Taub R. Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. *Hepatology* 31: 149-159, 2000.
55. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789-795, 2000.
56. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci* 113: 2813-2819, 2000.
57. Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Kubitz R, Schmitt M, Häussinger D, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Beuers U, Paumgartner G. Stable expression and functional characterization of a Na⁺-taurocholate cotransporting green fluorescent protein in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Cytotechnology* 34: 1-9, 2000.
58. Kurz AK, Block C, Graf D, vom Dahl S, Schliess F, Häussinger D. Phosphoinositide 3-kinase dependent Ras activation by tauroursodesoxycholate in rat liver. *Biochem J* 350: 207-213, 2000.
59. Kurz AK, Graf D, vom Dahl S, Schmitt M, Häussinger D. Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38 (MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats. *Gastroenterology* 121: 407-419, 2001.
60. Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 14: 44-55, 2007.
61. Lang R, Heeg K. Semiquantitative determination of human cytokine mRNA expression using TaqMan RT-PCR. *Inflammopharmacology* 6: 297-309, 1998.
62. Larrea E, Aldabe R, Molano E, Fernandez-Rodriguez CM, Ametzazurra A, Civeira MP, Prieto J. Altered expression and activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) in hepatitis C virus infection: in vivo und in vitro studies. *Gut* 55: 1188-1196, 2006.

63. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115: 2665-2672, 2005.
64. Lehmann U, Schmitz J, Weissenbach M, Sobota RM, Hortner M, Friederichs K, Behrmann I, Tsiaris W, Sasaki A, Schneider-Mergener J, Yoshimura A, Neel BG, Heinrich PC, Schaper F. SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *J Biol Chem* 278: 661-671. 2003.
65. Levin S, Bucci TJ, Cohen SM, Fix AS, Hardisty JF, Le Grand EK, Maronpot RR, Trump BF. The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol Pathol* 27: 484-490, 2002.
66. Levy DE, Kessler DS, Pine R, Reich N, Darnell JE Jr. Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. *Genes Dev* 2: 383-393, 1988.
67. Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, Shuai K. Inhibition of STAT1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10626-10631, 1998.
68. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146: 3-15, 1995.
69. Mehlen P, Bredesen DE. The dependence receptor hypothesis. *Apoptosis* 9: 37-49, 2004.
70. Myers MP, Andersen JN, Cheng A, Tremblay ML, Horvath CM, Parisien JP, Salmeen A, Barford D, Tonks NK. Tyk1 und Jak2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 276: 47771-47774, 2001.
71. Narazaki M, Fujimoto M, Matsumoto T, Morita Y, Saito H, Kajita T, Yoshizaki K, Naka T, Kishimoto T. Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling. *Proc Natl Acad Sci* 95: 13130-13134, 1998.
72. Padillo FJ, Andicoberry B, Muntane J, Lozano JM, Mino G, Sitges-Serra A, Solorzano G, Pera-Madrazo C. Cytokines and acute-phase response markers derangements in patients with obstructive jaundice. *Hepatogastroenterology* 48: 378-381, 2001.
73. Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med* 128: 127-137, 1998.

74. 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 Hepatology* 8: 406-413, 2001.
75. Plataniias LC, Fish EN. Signaling pathways activated by interferons. *Exp Hematol* 27: 1583-1592, 1999.
76. Podevin P, Rosmorduc O, Conti F, Calmus Y, Meier PJ, Poupon R. Bile acids modulate the interferon signalling pathway. *Hepatology* 29: 1840-1847, 1999.
77. Proud CG. PKR: a new name and new roles. *Trends Biochem Sci* 20: 241-246, 1995.
78. Quintanilla-Martinez L, Kremer M, Specht K, Calzada-Wack J, Nathrath M, Schaich R, Höfler H, Fend F. Analysis of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway in multiple myeloma: STAT3 activation and cyclin D1 dysregulation are mutually exclusive events. *Am J Pathol* 162: 1449-1461, 2003.
79. 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* 281: 23150-23166, 2006.
80. Reinehr R, Becker S, Keitel V, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation. *Gastroenterology* 129: 2009-2031, 2005.
81. Reinehr R, Becker S, Wettstein M, Häussinger D. Involvement of the Src family kinase Yes in bile salt-induced apoptosis. *Gastroenterology* 127: 1540-1557, 2004.
82. Reinehr R, Graf D, Fischer R, Schliess F, Häussinger D. Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. *Hepatology* 36: 602-614, 2002.
83. Reinehr R, Graf D, Häussinger D. Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation. *Gastroenterology* 125: 839-853, 2003.
84. Reinehr R, Häussinger D. CD95 activation in the liver: ion fluxes and oxidative signaling. *Arch Biochem Biophys* 462: 124-131, 2007.
85. Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med* 4: 165-178, 1998.

86. Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Differ* 6: 842-854, 1999.
87. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14: 778-809, 2001.
88. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407: 784-788, 2000.
89. Scafiddi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/FAS) signaling pathways. *EMBO J* 17: 1675-1687, 1998.
90. Schattenberg JM, Galle PR, Schuchmann M. Apoptosis in liver disease. *Liver Int* 26: 904-911, 2006
91. Schliess F, Häussinger D. Cell volume and insulin signaling. *Int Rev Cytol* 225: 187-228, 2003.
92. Schliess F, Häussinger D. Osmosensing and signaling in the regulation of liver function. *Contrib Nephrol* 152: 198-209, 2006.
93. Schliess F, Häussinger D. The cellular hydration state: a critical determinant for cell death and survival. *Biol Chem* 383: 577-583, 2002.
94. Schliess F, Häussinger D. The cellular hydration state: role in apoptosis and proliferation. *Signal Transduction* 6: 297-302, 2005.
95. Schliess F, Kurz AK, vom Dahl S, Häussinger D. Mitogen-activated protein kinases mediate the stimulation of bile acid secretion by tauroursodeoxycholate in rat liver. *Gastroenterology* 113: 1306-1314, 1997.
96. Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Pharmacol* 66: 1453-1458, 2003.
97. 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* 21: 12-17, 1994.
98. Sewnath ME, van der Poll T, van Noorden CJ, ten Kate FJ, Gouma DJ. Cholestatic interleukin-6-deficient mice succumb to endotoxin-induced liver injury and pulmonary inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 413-420, 2004.
99. Sies H. The use of perfusion of liver and other organs for the study of microsomal electron-transport and cytochrome P-450 systems. *Methods Enzymol* 52: 48-59, 1978.

100. Siewert E, Müller-Esterl W, Starr R, Heinrich PC, Schaper F. Different protein turnover of interleukin-6-type cytokine signalling components. *Eur J Biochem* 265: 251-257, 1999.
101. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67: 227-264, 1998.
102. 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* 278: 992-999, 2000.
103. Streetz KL, Tacke F, Leifeld L, Wüstefeld T, Graw A, Klein C, Kamino K, Spengler U, Kreipe H, Kubicka S, Müller W, Manns MP, Trautwein C. Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases. *Hepatology* 38: 218-229, 2003.
104. Streetz KL, Wüstefeld T, Klein C, Kallen KJ, Tronche F, Betz UA, Schütz G, Manns MP, Müller W, Trautwein C. Lack of gp130 expression in hepatocytes promotes liver injury. *Gastroenterology* 125: 532-543, 2003.
105. Thomis DC, Samuel CE. Mechanism of interferon action: characterization of the intermolecular autophosphorylation of PKR, the interferon-inducible, RNA-dependent protein kinase. *J Virol* 69: 5195-5198, 1995.
106. Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med* 339: 1217-1227, 1998.
107. Ueland PM, Holm PI, Hustad S. Betaine: a key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status. *Clin Chem Lab Med* 43: 1069-1075, 2005.
108. Van Cruchten S, van den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31: 214-223, 2002.
109. Veals SA, Schindler C, Leonard D, Fu XY, Aebersold R, Darnell JE Jr, Levy DE. Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 12: 3315-3324, 1992.
110. Vom Dahl, Schliess F, Reissmann R, Görg B, Weiergräber O, Kocalkova M, Dombrowski F, Häussinger D. Involvement of integrins in osmosensing and signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. *J Biol Chem* 278: 27088-27095, 2003.

111. Wagner TC, Velichko S, Vogel D, Rani MR, Leung S, Ransohoff RM, Stark GR, Perez HD, Croze E. Interferon signaling is dependent on specific tyrosines located within the intracellular domain of IFNAR2c. Expression of IFNAR2c tyrosine mutants in U5A cells. *J Biol Chem* 277: 1493-1499, 2002.
112. Wormald S, Hilton DJ. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* 279: 821-824, 2004.
113. Wüstefeld T, Klein C, Streetz KL, Betz U, Lauber J, Bür J, Manns MP, Müller W, Trautwein C. Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. *J Biol Chem* 278: 11281-11288, 2003.
114. Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprich E, Sokol RJ. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 33: 616-626, 2001.
115. Youssef W, McCullough AJ. Diabetes mellitus, obesity, and hepatic steatosis. *Semin Gastrointest Dis* 13: 17-30, 2002.
116. Zeuzem S. Heterogeneous virologic response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well? *Ann Intern Med* 140: 370-381, 2004.

Anhang

Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger für die Überlassung des Promotionsthemas und für die Möglichkeit der Ausführung meiner Promotionsarbeit sowie die Ermöglichung ausgezeichneter Arbeitsbedingungen an seinem Institut.

Weiterhin bin ich Herrn Dr. Dirk Graf zu großem Dank verpflichtet für die Unterstützung im Labor, für seine intensive Betreuung und unsere rege wissenschaftliche Diskussion. Die hervorragende Zusammenarbeit hat wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

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

Zuletzt möchte ich mich bei Herrn Dr. David Finis für die mit zeitlichem Aufwand verbundene Gestaltung der Abbildungen bedanken.

Lebenslauf

Ivo Paul Munks

geb. am	27.Januar 1981 in Willich
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch
1987-1991	Grundschule Wimmersweg, Krefeld
1991-2000	Fichte-Gymnasium, Krefeld
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
2000-2001	Zivildienst beim Krefelder Verein für Haus- und Krankenpflege e.V.
2001-2008	Studium der Humanmedizin an der Heinrich- Heine-Universität Düsseldorf mit Erlangung der Ärztlichen Approbation 07/2008

Abstract

In dieser Arbeit wurde der Effekt von proapoptotischen Stimuli wie CD95L, der Gallensäure GCDC und Hyperosmolarität auf hepatoprotektive Signalwege von IL-6 und IFN- α untersucht.

Primäre Rattenhepatozyten und HepG2-Zellen dienten als Modell, eine IL-6- und IFN- α -antagonistische Wirkung der proapoptotischen Stimuli zu zeigen.

Der Einfluss der beiden proapoptotischen Stimuli CD95L sowie Hyperosmolarität auf die IL-6-vermittelte Signaltransduktion wurde auf zwei Ebenen der Signaltransduktion analysiert, der Rezeptorebene und der Ebene der Aktivierung von STAT3.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CD95L und Hyperosmolarität eine Abnahme der Expression der signaltransduzierenden Untereinheit des IL-6-Rezeptorkomplexes gp130 sowie der STAT3-Phosphorylierung vermitteln.

Unsere Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass der Effekt von CD95L auf die gp130-Proteinspiegel nicht durch eine erhöhte lysosomale oder proteasomale Degradierung von gp130 erklärt werden kann. So ist es hingegen wahrscheinlich, dass gp130 ein Substrat für Caspasen darstellt und die Downregulation von gp130 in Anwesenheit von CD95L zur Inhibition der IL-6-induzierten STAT3-Aktivierung führt.

Hyperosmotischer Stress und hydrophobe Gallensäuren sind in der Lage die IFN- α -induzierte STAT1-Phosphorylierung zu inhibieren. Auch die IFN- α -vermittelte Expression des antiviralen Proteins MxA wird durch Hyperosmolarität vermindert. Betain als hepatoprotektiv wirkendes Osmolyt kann die Inhibition der IFN- α -induzierten MxA-Expression durch Hyperosmolarität aufheben, Taurin hingegen nicht.

Die Daten zeigen, dass proapoptotische Einflüsse wie der Ligand des Todesrezeptors CD95, hyperosmotischer Stress und hydrophobe Gallensäuren das IL-6- sowie das IFN- α -Signalling auf verschiedenen Ebenen inhibieren können.

Neben der klassischen Induktion der Apoptose können die oben genannten Stimuli somit hepatoprotektive Signalwege abschalten, die unter anderem Überlebenssignale und eine antivirale Wirkung vermitteln, und dadurch die Hepatotoxizität triggern.