

Molekulare Mechanismen der Akute Phase  
Reaktion:  
Transkriptionelle Regulation des  
C-reaktiven Proteins

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften



von Frank Kramer  
aus Sendenhorst

**Frankfurt am Main, 2006**

(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann  
Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Theodor Dingermann, Prof. Dr. Andreas E. Busch

Datum der Disputation: 03. Juli 2006

„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“

*Sir Isaac Newton*

meinen Eltern gewidmet

Abkürzungsverzeichnis.....	4
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Pathophysiologie der Atherosklerose .....</b>	<b>7</b>
1.1.1 Lokale Prozesse.....	7
1.1.1.1 Plaque-Bildung.....	7
1.1.1.2 Plaque-Ruptur und Thrombus-Bildung.....	9
1.1.2 Systemische Prozesse.....	10
<b>1.2 Akute Phase Reaktion .....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Signaltransduktionswege.....	13
1.2.1.1 Die Interleukin-6-induzierte Signaltransduktion.....	13
1.2.1.2 Die NFκB-Signaltransduktionskaskade .....	15
1.2.1.3 Die Familie der CCAAT/Enhancer-bindenden-Proteine .....	17
1.2.2 Akute Phase Proteine .....	18
1.2.2.1 C-reaktives Protein.....	20
<b>1.3 Zielsetzung .....</b>	<b>23</b>
<b>2 MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Zellkultur .....</b>	<b>24</b>
2.1.1 HepG2- und Hep3B-Zellen .....	24
2.1.2 Primäre humane Hepatozyten .....	24
<b>2.2 Reporter-Gen-Assays .....</b>	<b>25</b>
2.2.1 Herstellung eines CRP-Luciferase-Reporter-Gen-Assays .....	25
2.2.1.1 Klonierung eines humanen CRP-Promoter-Luciferase Konstruktes .....	25
2.2.1.2 Stabile Transfektion des CRP-Luciferase-Reporters .....	25
2.2.2 Luciferase-Reporter-Gen-Assay.....	26
<b>2.3 Genexpressionsanalysen auf mRNA-Ebene.....</b>	<b>26</b>
2.3.1 Isolation der Gesamt-RNA aus Zellkulturproben .....	26
2.3.2 Quantitative Reverse Transkriptase-PCR in Echtzeit .....	26
2.3.3 Globale Genexpressionsanalyse mittels cDNA-Microarrays.....	28
<b>2.4 Genexpressionsanalyse auf Protein-Ebene .....</b>	<b>30</b>
2.4.1 SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse.....	30
2.4.2 “Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay” / ELISA .....	31
2.4.3 Immunohistochemische Bestimmung .....	31
<b>2.5 Gentransfer und siRNA-Transfektion .....</b>	<b>32</b>
2.5.1 Liposomale Plasmid Transfektion.....	32
2.5.2 Adenoviraler Gentransfer .....	32
2.5.3 siRNA-Technologie .....	32
2.5.3.1 Liposomale Transfektion von siRNA-Oligonukleotiden.....	33

<b>2.6 Reagenzien und Zubereitungen .....</b>	<b>35</b>
2.6.1 Plasmide .....	35
2.6.2 Antikörper .....	35
2.6.2.1 Neutralisierung der IL-6-Bioaktivität.....	36
2.6.3 Zytokine .....	36
2.6.4 Reagenzien .....	37
2.6.4.1 Chemische Aktivatoren der Genexpression .....	37
2.6.4.2 Chemische Inhibitoren .....	37
<b>2.7 Statistische Analyse .....</b>	<b>39</b>
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 CRP-Luciferase-Reporter-Gen-Assay .....</b>	<b>40</b>
3.1.1 Effekte einer Proteinkinase C-Inhibition auf die CRP-Promoteraktivität.....	41
3.1.2 Effekte einer IKK-Inhibition auf die CRP-Promoteraktivität.....	42
<b>3.2 Immunohistochemische Detektion der Proteinkinase C beta II .....</b>	<b>44</b>
<b>3.3 NFκB-Luciferase-Reporter-Gen-Assay .....</b>	<b>44</b>
<b>3.4 CRP-Expression in primären humanen Hepatozyten .....</b>	<b>45</b>
3.4.1 Behandlung von PHH mit Zytokinen und Phorbol ester.....	45
<b>3.5 Primäre humane Hepatozyten und Hep3B-Zellen als Modell der Akuten Phase Reaktion .....</b>	<b>49</b>
3.5.1 Globale Genexpressionsanalyse in Hep3B-Zellen nach Zytokin-Behandlung.....	49
3.5.1.1 Qualitätskontrolle der durch cDNA-Microarrays generierten Datensätze.....	49
3.5.1.2 Identifizierung differentiell exprimierter Gene .....	50
3.5.1.3 Zuordnung ausgewählter Gene zu definierten Genclustern .....	52
3.5.2 Mechanismen der CRP-Expression in PHH.....	57
3.5.2.1 Vergleich der Expression einzelner Akute Phase Proteine in primären humanen Hepatozyten und Hep3B-Zellen.....	57
3.5.2.2 IL-6-Expression in primären humanen Hepatozyten und Hep3B-Zellen .....	58
3.5.2.3 Behandlung von PHH mit dem Proteinbiosynthese-Inhibitor Cycloheximide ....	59
3.5.2.4 Behandlung von PHH mit neutralisierenden Interleukin-6-Antikörpern.....	60
3.5.2.5 Behandlung von PHH mit einem spezifischen JAK-Kinase-Inhibitor.....	60
3.5.2.6 Überexpression einer dominant-negativen Variante des IκBα-Proteins in PHH 61	
3.5.3 Etablierung der Hepatomazelllinie Hep3B als Modell zur Untersuchung regulatorischer Mechanismen der Akuten Phase Reaktion.....	64
3.5.3.1 Behandlung von Hep3B-Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen.....	64
3.5.3.2 Die IL-6-induzierte Signaltransduktion in Hep3B-Zellen .....	66
3.5.3.3 Die IL-1β- und TNFα- induzierte Signaltransduktion in Hep3B-Zellen .....	79
3.5.3.4 Unterschiede der IL-1β- und TNFα-induzierten Genexpression .....	85
3.5.3.5 Inhibition der IκBξ-Expression in Hep3B-Zellen durch siRNA .....	89
3.5.3.6 IκBξ-Überexpression in Hep3B-Zellen.....	90
<b>3.6 In silico-Promoter-Analyse.....</b>	<b>92</b>
3.6.1 Analyse der Promoter definierter Gengruppen .....	92
3.6.2 Analyse des CRP-Promoters .....	95

<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>96</b>
4.1 Zelluläre Modelle zur Untersuchung regulatorischer Mechanismen der Akuten Phase Reaktion .....	96
4.2 Globale Genexpressionsanalyse in Zytokin-aktivierten Hep3B-Zellen.....	97
4.3 Beteiligung der Proteinkinase C an der transkriptionellen Regulation der CRP-Synthese.....	99
4.4 IL-1 $\beta$ -induzierte CRP-Transkription in primären humanen Hepatozyten.....	100
4.5 Signaltransduktion in Hep3B-Zellen.....	101
4.5.1 Die IL-6-Signaltransduktion .....	102
4.5.2 Die Rolle der CCAAT/Enhancer-bindenden Proteine in der Expressionskontrolle des C-reaktiven Proteins.....	102
4.5.3 I $\kappa$ B $\xi$ als Regulator der Expression verschiedener Akute Phase Proteine .....	106
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>109</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>112</b>
<b>7 ANHANG .....</b>	<b>122</b>
Veröffentlichungen.....	122
Danksagung.....	125
Lebenslauf.....	126
Eidesstattliche Erklärung.....	128

## Abkürzungsverzeichnis

**AHA** American Heart Association  
**ALB** Albumin  
**AngII** Angiotensin II  
**Apo-E / Apo-A** Apolipoprotein A/E  
**APP** Akute Phase Protein  
**APR** Akute Phase Reaktion  
**APRIP** acute phase regulated intracellular protein  
**cDNA** complementary DNA  
**C/EBP** CCAAT/Enhancer bindendes Protein  
**CRP** C-reaktives Protein  
**Cpn** *Chlamydia pneumoniae*  
**Ct-1** Cardiotrophin-1  
**DAG** Diacylglycerol  
**DH** durchschnittliche Häufigkeit  
**EDRF** endothelial derived relaxing factor  
**EHF** Ets homologue factor  
**ELISA** enzyme linked immunosorbent assay  
**FGA** Fibrinogen A  
**FGB** Fibrinogen B  
**gp130** Glykoprotein 130  
**HAMP** hepatic antimicrobial peptide  
**h** Stunde  
**HDL** high density lipoprotein  
**HP** Haptoglobin  
**HSV-1** *Herpes simplex labialis* Virus-1  
**ICAM-1** intercellular adhesion molecule-1  
**IHC** Immunohistochemie  
**IFN $\gamma$**  Interferon gamma  
**I $\kappa$ B $\alpha$**  inhibitor of nuklear factor kappa B-lymphocyte alpha  
**I $\kappa$ B $\xi$**  inhibitor of nuklear factor kappa B-lymphocyte zeta  
**IL-1 $\beta$**  Interleukin-1beta  
**IL-6** Interleukin-6  
**IL-6R $\alpha$**  Interleukin-6 Rezeptor-Untereinheit alpha

**IL-8** Interleukin-8  
**IMT** intima media thickness  
**IP<sub>3</sub>** Inositol-1,4,5-triphosphat  
**IVT** *in vitro*-Transkription  
**JAK** Janus Kinase  
**kDa** Kilo Dalton  
**KHK** Koronare Herzkrankheit  
**Ktrl.** Kontroll(e)  
**L** Liter  
**μL** Mikroliter  
**LCN2** Lipocalin 2  
**LDL** low density lipoprotein  
**LIF** leukemia inhibitory factor  
**LogR** Logarithmus der Ratio = logarithmische Darstellung der Expression vs. unbehandelte Zellen  
  
**LPS** Lipopolysaccharid  
**LTB<sub>4</sub>** Leukotrien B<sub>4</sub>  
**LTC<sub>4</sub>** Leukotrien C<sub>4</sub>  
**LTD<sub>4</sub>** Leukotrien D<sub>4</sub>  
**LTE<sub>4</sub>** Leukotrien E<sub>4</sub>  
**Luc** Luciferase  
**MCP-1/3** Monozyten chemotktisches Protein 1/3  
**M-CSF** macrophage colony stimulating factor  
**mg** Milligramm  
**MI** Myocard Infarkt  
**mL** Milliliter  
**MMP** Matrix metallo proteinase  
**mRNA** messenger RNA  
**μM** mikromolar  
**nM** nanomolar  
**NFκB** nuklear factor kappa B-lymphocyte  
**NFKBIA** nuklear factor kappa B-lymphocyte inhibitor alpha = IκBα  
**NFKBIZ** nuklear factor kappa B-lymphocyte inhibitor zeta = IκBξ  
**ng** Nanogramm  
**NO** Stickstoffmonoxid



**OSM** Oncostatin-M  
**PAV** Periphere arterielle Verschlusskrankheit  
**PDGF** plateled derived growth factor  
**PGI<sub>2</sub>** Prostaglandin I<sub>2</sub>  
**PGE<sub>2</sub>** Prostaglandin E<sub>2</sub>  
**PGD<sub>2</sub>** Prostaglandin D<sub>2</sub>  
**PGF<sub>2α</sub>** Prostaglandin F<sub>2α</sub>  
**PIP<sub>3</sub>** Phosphatitdyl-Inositol-4,5-bisphosphat  
**PLC** Phospholipase C  
**qRT-PCR** quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction  
**RA** rheumatoide Arthritis  
**SAA** Serum Amyloid A  
**sec** Sekunde  
**siRNA** small interference RNA  
**sPLA<sub>2</sub>** sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub>  
**STAT3** signaltransducer and activator of transcription 3  
**SUMO** small ubiquitin related modifier  
**TF** tissue factor  
**TF** Transkriptionsfaktor  
**TF-F** Transkriptionsfaktor-Familie  
**TGFβ** tissue growth factor beta  
**TNFAIP3** Tumornekrose Faktor alpha induziertes Protein 3  
**TNFα** Tumornekrose Faktor alpha  
**TXA<sub>2</sub>** Thromboxan A<sub>2</sub>  
**VCAM-1** vascular cell adhesion molecule-1  
**VLDL** very low density lipoprotein  
**VNN1/3** Vannin 1/3  
**WB** Western-Blot-Analyse  
**ZH** durchschnittliche zufällige Häufigkeit

# **1 Einleitung**

## **1.1 Pathophysiologie der Atherosklerose**

Bedeutende Herzkreislauferkrankungen wie koronare Herzkrankheit (KHK), Myokardinfarkt (MI), periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAV) und Apoplex sind in den meisten Fällen auf die Bildung atherosklerotischer Gefäßablagerungen zurückzuführen und stellen somit formenreiche Symptome der Atherosklerose und deren Komplikationen dar.

Nach heutigem Verständnis handelt es sich bei der Atherosklerose um einen komplexen Prozess mit sowohl lokalen als auch systemischen Komponenten, wobei sich im Verlauf der vergangenen Jahrzehnte die Beurteilung darüber, welche Faktoren für die Entstehung und den Verlauf der Atherosklerose verantwortlich sind, grundlegend geändert hat.

### **1.1.1 Lokale Prozesse**

#### **1.1.1.1 Plaque-Bildung**

Ging man zu Anfang des vergangenen Jahrhunderts noch davon aus, daß der Atherosklerose im wesentlichen eine fortschreitende Ablagerung von Lipiden in der arteriellen Wandung (Anitschkow *et al.*, 1913) oder das Eindringen eines Thrombus in die Gefäßwandung zugrunde liegt (Weissberg *et al.*, 2000), so wurde im Laufe der Zeit deutlich, daß eine endotheliale Dysfunktion als einer der bedeutendsten auslösenden Faktoren anzusehen ist (Willerson *et al.*, 2003).

Grundlage für eine Schädigung des Gefäßendothels sind proinflammatorische Stimuli wie Übergewicht, Typ-II-Diabetes und Tabak-Konsum. Durch diese Faktoren kommt es u.a. zu einer vermehrten Bildung sogenannter proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ), Tumornekrose Faktor alpha (TNF $\alpha$ ) und Interleukin-6 (IL-6), was nachfolgend in Endothel- und Glattmuskelzellen zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen, wie vaskuläres Zell-Adhäsionsmolekül (VCAM), interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM) und von Selektinen führt. Auch die Freisetzung chemotaktischer Proteine wie Interleukin-8 (IL-8), Monozyten-Chemotaktisches-Protein-1 und -3 (MCP-1, MCP-3) wird durch genannte Zytokine begünstigt (Price *et al.*, 1999). Faktoren wie die Chemokin-Produktion in Kombination mit der Bildung von Adhäsionsmolekülen bewirken zunächst eine Annäherung zirkulierender Monozyten an die Oberfläche des aktivierten Endothels, sowie nachfolgend ein durch Selektine vermitteltes Rollen der Monozyten über das Endothel. Integrine, die vermehrt in diesem Bereich gebildet werden, vermitteln eine starke Interaktion zwischen Endothel und Monozyt, in deren Folge es zu einer rezeptorvermittelten Monozyten-Transmigration in die

Intima der Gefäßwand kommt (Boring *et al.*, 1998). Im Bereich der Intima bewirkt der Einfluß proinflammatorischer Zytokine die Expression von Monozyten koloniestimulierendem Faktor (M-CSF), der eine Transformation der eingewanderten Monozyten in aktive Makrophagen induziert (Smith *et al.*, 1995). Diese sind, vermittelt durch sogenannte Scavenger-Rezeptoren der Makrophagen-Oberfläche, in der Lage, modifizierte LDL-Partikel aufzunehmen (Kunjathoor *et al.*, 2002). Die Existenz oxidativ modifizierter Lipide ist auf erhöhte Plasma-Lipoprotein-Konzentrationen, gepaart mit der vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, oder anderer Radikale zurückzuführen.

Eine übermäßige Phagozytose dieser modifizierten Lipidpartikel leitet die Umwandlung der Makrophagen in sogenannte Schaumzellen ein, die im weiteren Verlauf der Entstehung des atherosklerotischen Plaques eine zentrale Rolle spielen. Zum einen kommt es durch die Aktivierung der Monozyten zu einer Amplifikation des inflammatorischen Stimulus, da sie die Genexpression von Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  nach sich zieht. Zum anderen bewirkt die Ausschüttung verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie „Platelet-Derived-Growth-Factor“ (PDGF) bereits in dieser frühen Phase der Plaque-Bildung die Proliferation und die Migration von Glattmuskelzellen aus der *Tunica media* (Media) in den Bereich des inflammatorischen Geschehens der *Tunica interna* (Intima). Letzterer Vorgang ist, neben der Akkumulation von Schaumzellen, einer der wesentlichen Faktoren, der zur räumlichen Ausdehnung des atherosklerotischen Plaques führt und damit eine Verringerung der luminalen Gefäßweite nach sich zieht. Desweiteren kommt es im Bereich der Plaque-Kappe zu einer den Plaque stabilisierenden Bildung von kollagenösem Gewebe durch eingewanderte Glattmuskelzellen, so daß der weiche Lipidkern in luminaler Richtung durch festes Bindegewebe begrenzt ist. Der Volumenzuwachs des subendothelialen Plaques und der andauernde inflammatorische Zustand zieht eine dauerhafte Schädigung und ggf. auch vollständige Zerstörung des Endothels nach sich. Da Endothelzellen als Syntheseort essentieller antithrombotischer Substanzen, wie Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), und vasodilatierender Stoffe, wie Stickstoffmonoxid (NO) eine wichtige Rolle in der komplexen Regulation der Durchblutung und Blutgerinnung spielen, kommt es durch eine Endothelschädigung zum lokalen Verlust wichtiger antiobstruktiver und antithrombotischer Einflüsse. Hierzu gehört auch die Fähigkeit freigesetzten NOs, selektiv die lokale Bildung proinflammatorischer Zytokine und die Expression von VCAM-1 zu inhibieren (De Caterina *et al.*, 1995). Neben der verminderten Produktion vasodilatatorischer Faktoren führt die Plaque-Bildung auch zu

einer vermehrten Freisetzung von stark vasokonstriktorisch wirkenden Endothelinen aus Endothelzellen.

### 1.1.1.2 Plaque-Ruptur und Thrombus-Bildung

Der Verlust antithrombotischer Wirkung gekoppelt, mit multifaktoriell ausgelöster Vasokonstriktion im Bereich eines ohnehin bereits durch den Plaque verengten Blutgefäßes, begünstigt die Bildung von Abscheidungs- bzw. Gerinnungsthromben.

Thrombusbildung als wichtigste und unter Umständen schwerwiegendste Komplikation der Atherosklerose wird aber nicht ausschließlich durch die Verringerung des Gefäßquerschnittes und der damit verbundenen Umwandlung der laminaren Blutströmungsverhältnisse in turbulente begünstigt, sondern hat oftmals eine Ruptur des atherosklerotischen Plaques zur Grundlage. Eine der fatalsten Folgen des Aufbrechens einer Läsion stellt der plötzliche Herztod dar, dem in 73% der Fälle eine Plaque-Ruptur zugrunde liegt (Davis *et al.*, 1992).

Allerdings sind Plaque-Rupturen nicht zwangsläufig die Konsequenz der atherosklerotischen Veränderung der Gefäßwand, und wenn sie auftreten, müssen sie nicht unbedingt zu einem Verschluss des betroffenen Gefäßes führen. Ob es sich aber um einen stabilen Plaque handelt, oder das Risiko einer Ruptur hoch ist, läßt sich nur schwer vorhersagen.

In den vergangenen Jahren wurde versucht, die durch histologische Präparationen bzw. durch *in vivo*-Bildgebungsverfahren gewonnenen Informationen über den Plaqueaufbau für eine Klassifizierung atherosklerotischer Plaques zu verwenden. Ziel war es, eine Korrelation zwischen der beim Patienten diagnostizierten Plaqueausprägung und dem damit potentiell bestehenden kardiovaskulären Risiko herzustellen. Es hat sich die Einteilung nach Virmani *et al.* (ATVB 2000) durchgesetzt, die eine Erweiterung bzw. Modifikation der zuvor von der American-Heart-Association (AHA) aufgestellten Unterteilung in Typ I – VI vorschlägt.

Hier soll im folgenden aber nicht im Detail auf die verschiedenen Typen atherosklerotischer Plaques eingegangen werden, sondern nur die Mechanismen beschrieben werden, die zu einer Ruptur der Läsionen führen können. In jedem Falle kommt es durch das Aufreißen des Plaques zu einer Freisetzung eines hochreaktiven thrombogenen Gemisches. Auslöser dieses Ereignisses ist das Zusammenspiel von Faktoren, die von luminaler Seite auf den Plaque einwirken, sowie eine langsam fortschreitende Veränderung der Plaque-Morphologie. So ist der Plaque durch seine exponierte Lage im Strömungsfeld größeren Scherkräften ausgesetzt als andere Regionen der Gefäßwandung, was seine Erosion begünstigt. Ein größeres Risiko geht aber von Prozessen aus, die sich im Inneren der veränderten Gefäßwandung abspielen. T-Lymphozyten und Makrophagen, die im Verlauf der fortschreitenden Plaque-Expansion

vermehrt in das entzündete Gewebe infiltrieren (Ross *et al.*, 1999), sowie bereits vorhandene Schaumzellen produzieren proteolytische Enzyme wie Kollagenasen und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) (Galis *et al.*, 2002). Insbesondere in der Schulter der Läsion exprimieren Glattmuskelzellen Vertreter der Cathepsin-Familie (Cathepsin K & S) und lösen damit den Abbau von stabilisierenden Strukturbestandteilen des Plaques aus (Sukhova *et al.*, 1998). Prinzipiell könnte eine durch Gewebewachstumsfaktor-beta (TGF- $\beta$ ) induzierte Kollagen-Resynthese die Effekte der proteolytischen Aktivität abfangen, da TGF- $\beta$  permanent im Bereich der Läsion gebildet wird. Da die Region des Plaques aber durch eine verringerte Expression verschiedener TGF- $\beta$ -Rezeptoren charakterisiert ist (Bobik *et al.*, 1999), ist der protektive Mechanismus der Kollagen-Neusynthese nicht aktiv. Zusätzlich inhibiert das von T-Lymphozyten im Milieu der Inflammation gebildete Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) eine eingeschränkte Bildung von plaquestabilisierendem Kollagen (Libby *et al.*, 1996).

Man kann zusammenfassend festhalten, daß eine Koexistenz von inflammatorischen Prozessen mit der damit verbundenen Zytokin- und Chemokinfreisetzung und eine Erhöhung der Plasmalipid-Konzentration eine wichtige Basis für die Schädigung des Endothels darstellen und damit verbunden die Bildung atherosklerotischer Plaques fördern und die Atherosklerose-Progression begünstigen.

### **1.1.2 Systemische Prozesse**

Da es, bedingt durch die Lage der atherosklerotischen Plaques im Gefäßbett, zu einem permanenten Austausch von Botenstoffen zwischen Plasma und Läsion kommt, ist es verständlich, daß die Atherosklerose nicht isoliert als lokales Geschehen betrachtet werden darf. So läßt sich bei dieser Erkrankung auch keine genaue Unterscheidung zwischen Effektor und Effekt treffen. Systemische Veränderungen können Auslöser für die Bildung lokaler Gefäßwandveränderungen sein, genauso wie letztere wiederum weitreichenden Einfluß auf den gesamten Organismus haben. Mittlerweile hinlänglich belegt ist die Tatsache, daß proinflammatorische Zytokine, deren Produktion durch verschiedenste Faktoren in unterschiedlichsten Geweben ausgelöst wird, nicht nur, wie bereits zuvor beschrieben, lokal die Plaque-Bildung auslösen und fördern können, sondern, daß durch die gleichen Botenstoffe umfangreiche systemische Veränderungen vermittelt werden. Die Expression proinflammatorische Zytokine ist ein Resultat bakterieller bzw. viraler Infektion, mechanischer bzw. chemischer Gewebsverletzungen oder übermäßiger UV- Exposition.

Desweiteren lösen, wie bereits eingangs erwähnt, Faktoren wie Rauchen, bestehender Typ-II-Diabetes, andauernde Hypertonie und Adipositas die Produktion dieser biologischen Botenstoffe aus.

### 1.2 Akute Phase Reaktion

Als Akute Phase Reaktion (APR) bezeichnet man die erste unmittelbare systemische Antwort, mit der der Körper auf die lokale Produktion proinflammatorischer Zytokine reagiert. Hierbei vollzieht der Organismus eine Vielzahl von neuroendokrinen, hämatopoetischen und metabolischen Veränderungen, die eine Grundlage zur Abwehr der Gefahren, die von Infektionen oder Gewebsverletzungen ausgehen, darstellen (siehe **Tabelle 1**).

**Tab.1 Neuroendokrine, hämatopoetische und metabolische Anpassungsreaktionen, die der Körper im Rahmen der Akuten Phase Reaktion vollzieht** (modifiziert nach Gabay *et al.*, 1999).

Neuroendokrine Veränderungen	Haematopoetische Veränderungen	Metabolische Veränderungen	Hepatische Veränderungen	Veränderungen d. Plasmamineralkonz.
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Fieber</li> <li>· Schläfrigkeit</li> <li>· verminderte Katecholamin-ausschüttung</li> <li>· erhöhte Kortisolausschüttung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Anaemie</li> <li>· Leukozytose</li> <li>· Thrombozytose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Verringerte Glukoneogenese</li> <li>· erhöhte Lipolyse &amp; Lipogenese</li> <li>· Kachexie</li> <li>· Osteoporose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Modulation der Genexpression verschiedener Enzyme &amp; Plasmaproteine etc.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Hypozinkaemie</li> <li>· Hypoferraemie</li> <li>· Hypercupraemie</li> </ul>

So kommt es im Verlauf der APR nach Aktivierung der Arachidonsäurekaskade zur lokalen Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Synthese, die zu einer Körpertemperatur-Sollwert Veränderung im Hypothalamus führt und dadurch nachfolgend das Symptom des Fiebers auslöst (Dinarello *et al.*, 1988 & 1991). Weitere Abkömmlinge der Arachidonsäure vermitteln lokale Effekte. Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) und die Leukotriene C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) induzieren eine durch Glattmuskelkontraktion ausgelöste Vasokonstriktion. Zusätzlich ist (TXA<sub>2</sub>) ein wichtige Mediator der Koagulation. Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) fördert durch chemotaktische Eigenschaften lokale Entzündungsprozesse. Das Einwandern von Monozyten in die entzündlichen Bereiche des Gewebes wird durch vasodilatatorische Effekte der Prostaglandine I<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, und F<sub>2</sub>-alpha (PGI<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>α) begünstigt. Neben diesen zentral regulierten und lokal am Ort der Entzündung ablaufenden Prozessen spielen Modifikationen

im Stoffwechsel der Leber, die als zentrales Organ der Akuten Phase Reaktion anzusehen ist, eine Schlüsselrolle. Zytokine wie IL-6, TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$ , die mit dem Blutstrom die Leber erreichen, lösen, vermittelt über entsprechende Rezeptoren, in Hepatozyten eine differentielle Genexpression aus (Koj *et al.*, 1985). Durch die Aktivierung verschiedener, teilweise Hepatozyten-exklusiver Transkriptionsfaktoren, wird eine vermehrte bzw. verringerte Expression verschiedener sogenannter Akute Phase Proteine (APP) vermittelt. Die differentielle Genexpression von Plasmaproteinen bewirkt die Veränderung einer Vielzahl serologischer Parameter im Verlauf der APR.

Wichtige Aufgabe der verschiedenen APPs ist es, die Gefahren, die von einer mikrobiellen Invasion ausgehen oder die durch eine mechanische oder chemische Verletzung ausgelöst wurden, zu minimieren und daran teilzuhaben, den ursprünglichen nicht-inflammatorischen Zustand wieder herzustellen. APPs sind ebenso an der Eliminierung pathogener Fremdstoffe beteiligt wie an der Initiierung verschiedener Heilungsprozesse.

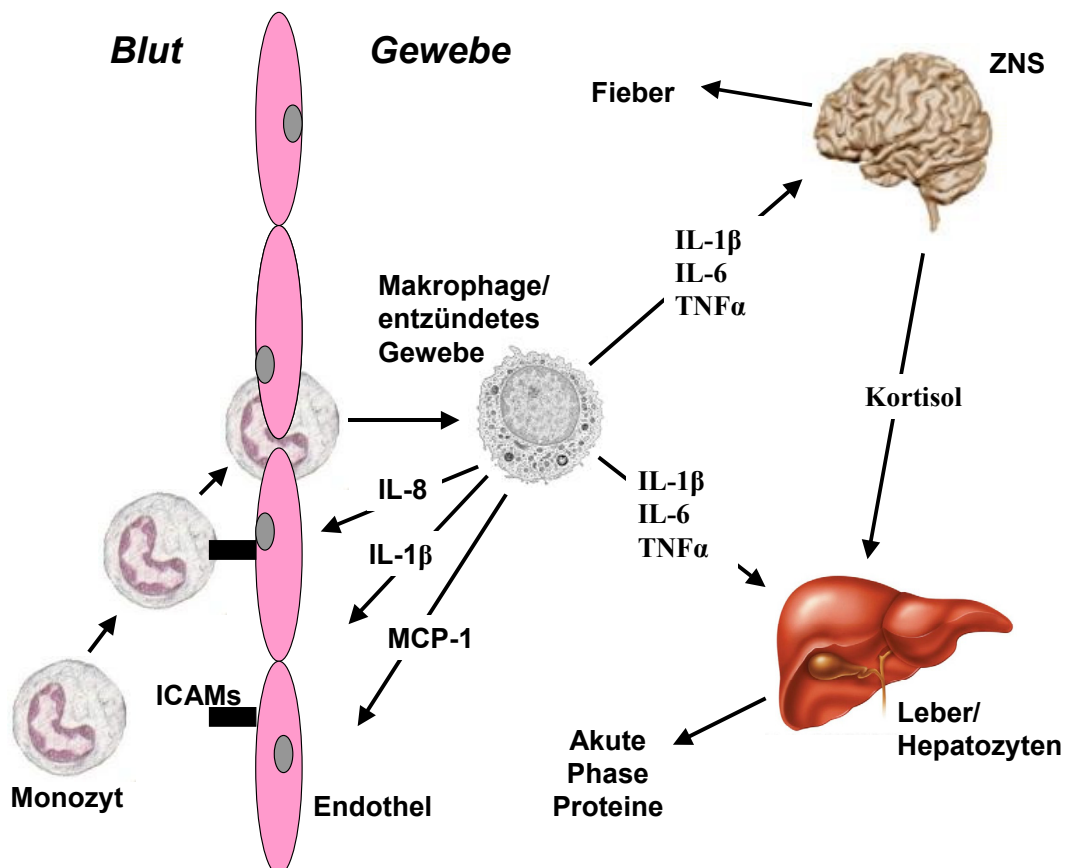


Abb.1 Interaktion verschiedener Gewebe im Zustand der Akuten Phase Reaktion.

### 1.2.1 Signaltransduktionswege

In den folgenden Abschnitten werden die wichtigsten bisher bekannten Signaltransduktionskaskaden, die im Kontext der APR von Bedeutung sind, beschrieben. Ferner wird das C-reaktive Protein (CRP), als eines der bedeutendsten Akute Phase Proteine, charakterisiert und seine biologische und klinische Relevanz beschrieben.

#### 1.2.1.1 Die Interleukin-6-induzierte Signaltransduktion

Interleukin-6 bildet zusammen mit Oncostatin-M (OSM), Cardiotrophin-1 (Ct-1) und „Leukaemia-Inhibitory-Factor“ (LIF) eine Familie der Zytokine, die nicht nur im Rahmen der APR eine zentrale Rolle als Aktivatoren bzw. Inhibitoren der Genexpression spielen, sondern auch für die Haematopoese, für die Regeneration der Leber, die embryonale Reifung und die Fertilität von großer Bedeutung sind. Dysregulationen in der IL-6-Produktion und dessen Signaltransduktion sind u.a. mitverantwortlich für die Entstehung schwerwiegender Erkrankungen, wie der Rheumatoiden Arthritis, der Osteoporose, der Multiplen Sklerose, der chronischen entzündlichen Darmerkrankung sowie verschiedener Krebsleiden.

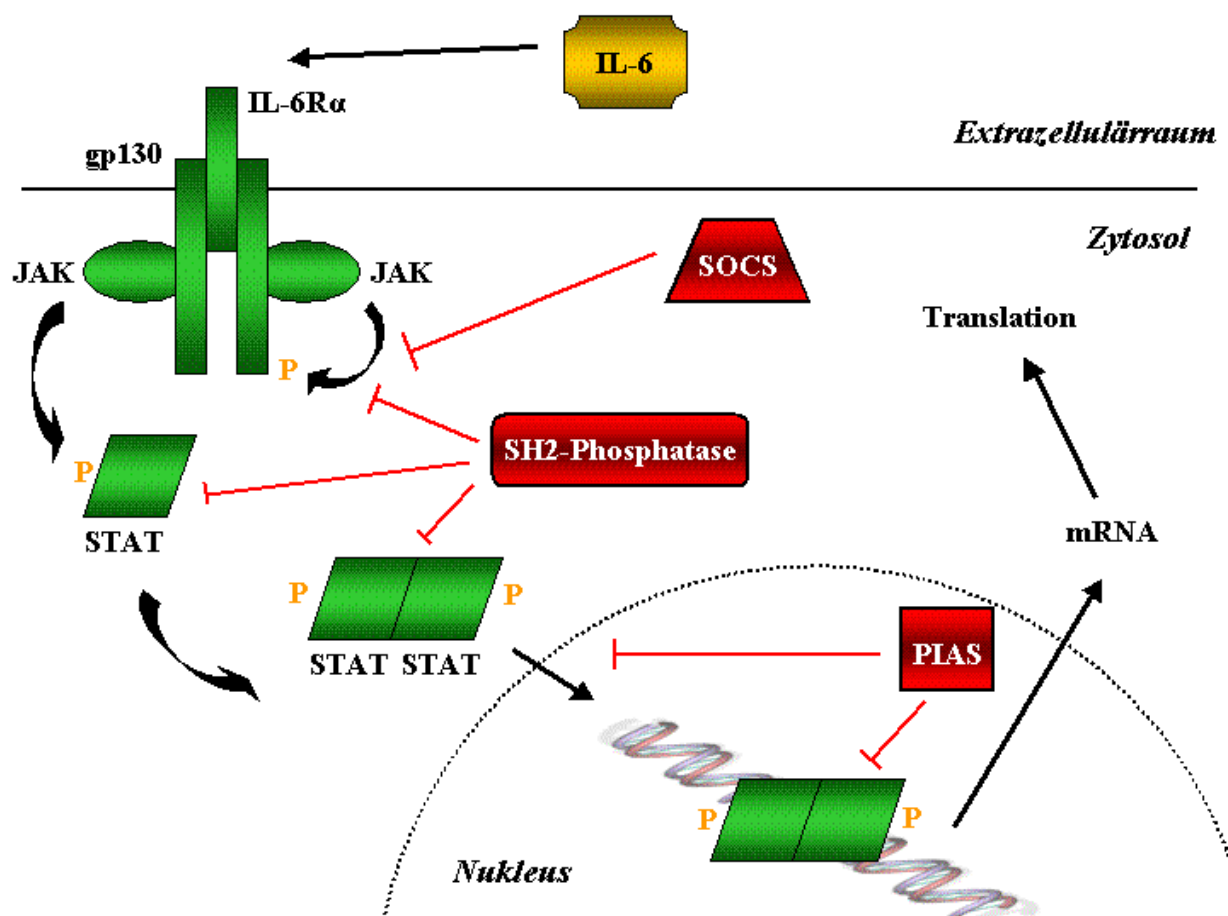


Abb.2 Die IL-6-Signaltransduktionskaskade.



An der Interleukin-6-Signaltransduktion sind zwei verschiedene Rezeptoruntereinheiten beteiligt, von denen die eine, die sogenannte Interleukin-6-Rezeptor alpha Untereinheit (IL-6R $\alpha$ ), in einem ersten Schritt direkt mit dem Zytokin interagiert (**Abb.2**). Der dabei gebildete IL-6/IL-6R $\alpha$ -Komplex ist nicht zu einer Signalweiterleitung fähig, sondern rekrutiert zu diesem Zweck zwei Glykoprotein-130-Rezeptoruntereinheiten (gp130), die für eine sofortige Internalisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes verantwortlich sind (Heinrich *et al.*, 1998). In einem weiteren Schritt binden Vertreter der Familie der Janus-Kinasen (JAKs) an membrannahe hydrophobe Bereiche der gp130-Rezeptoren, und es kommt nachfolgend zu einer Tyrosin-Phosphorylierung des gp130-Rezeptors durch die Kinase (Stahl *et al.*, 1994). Durch diese Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Motive werden SH2-Domänen-vermittelt zytosolische STAT-Transkriptionsfaktoren („Signal Transducer and Activator of Transcription“) an den gp130-Rezeptor gebunden und ihrerseits am Tyrosin-705 phosphoryliert (Heim *et al.*, 1995, Hemmann *et al.*, 1996). Nach Dissoziation des Transkriptionsfaktors vom Rezeptor kommt es im Falle von STAT3 zu einer Homodimerisierung, die als Voraussetzung für die Translokation der aktiven STATs in den Zellkern und die daraus folgende transkriptionelle Aktivierung angesehen wird (Kaptein *et al.*, 1996). Im Zusammenhang mit der IL-6-Signaltransduktion spielen auch verschiedene inhibitorische Proteine, die in der Lage sind, die transkriptionelle Aktivität nach der Rezeptoraktivierung zu beenden, eine wichtige Rolle. Hier sind als wichtigste Mechanismen die Tyrosin-Dephosphorylierung durch SH2-Phosphatasen und die Aktivität der inhibitorischen Proteine SOCS3 („Suppressor of Cytokine Signalling 3“) und PIAS3 („Protein Inhibitor of Activated STAT3“) zu nennen. SOCS3, dessen Expression nach dem Prinzip eines negativen Rückkopplungsmechanismus IL-6-induziert ist, inhibiert auf drei verschiedene Weisen die IL-6-Signaltransduktion. 1) Durch Interaktion seiner SH2 -Domäne mit Phosphotyrosin-Resten in aktivierten gp130-Rezeptoruntereinheiten wird kompetitiv die STAT3-Bindung inhibiert (Schmitz *et al.*, 2000). 2) Eine direkte Bindung von SOCS3 an JAKs inhibiert die Aktivität der Tyrosin-Kinase. 3) Durch die Fähigkeit des SOCS3-Proteins, die JAK- und STAT3-Ubiquitinylierung zu induzieren, wird die proteolytische Spaltung dieser IL-6-Signaltransduktions-Komponenten durch das Proteasom ausgelöst und die Expression IL-6-abhängiger Gene unterdrückt (Kamizono *et al.*, 2001). PIAS3 interagiert selektiv mit durch Tyrosin-705-Phosphorylierung aktiviertem STAT3 und verhindert dadurch dessen DNA-Bindung, was zur Inhibition der STAT3-abhängigen Genexpression führt (Chung *et al.*, 1997). Desweiteren wird diskutiert, daß PIAS3 durch

Interaktion mit STAT3 dessen Sumoylierung auslösen kann und dadurch als Inhibitor der STAT3-Kerntranslokation fungiert (Rogers *et al.*, 2003). Als Sumoylierung bezeichnet man die Übertragung kleiner Ubiquitin-ähnlicher Polypeptide (SUMO = „small ubiquitin related modifier“), die zu zahlreichen Modifikationen des Zielproteins führen kann und unter Umständen eine Inaktivierung, Translokation oder Degradierung des Proteinkomplexes auslöst (Girdwood *et al.*, 2004).

### 1.2.1.2 Die NFκB-Signaltransduktionskaskade

Die Signaltransduktion, die zur Aktivierung der NFκB-Transkriptionsfaktoren führt, stellt einen komplizierten Apparat dar, der seit geraumer Zeit Objekt intensiver Forschung ist, aber immer noch nicht in allen Einzelheiten entschlüsselt werden konnte. Hier soll im folgenden nur ein grober Überblick über wichtige regulatorische Mechanismen, die im Rahmen inflammatorischer Prozesse von Bedeutung sind, gegeben werden.

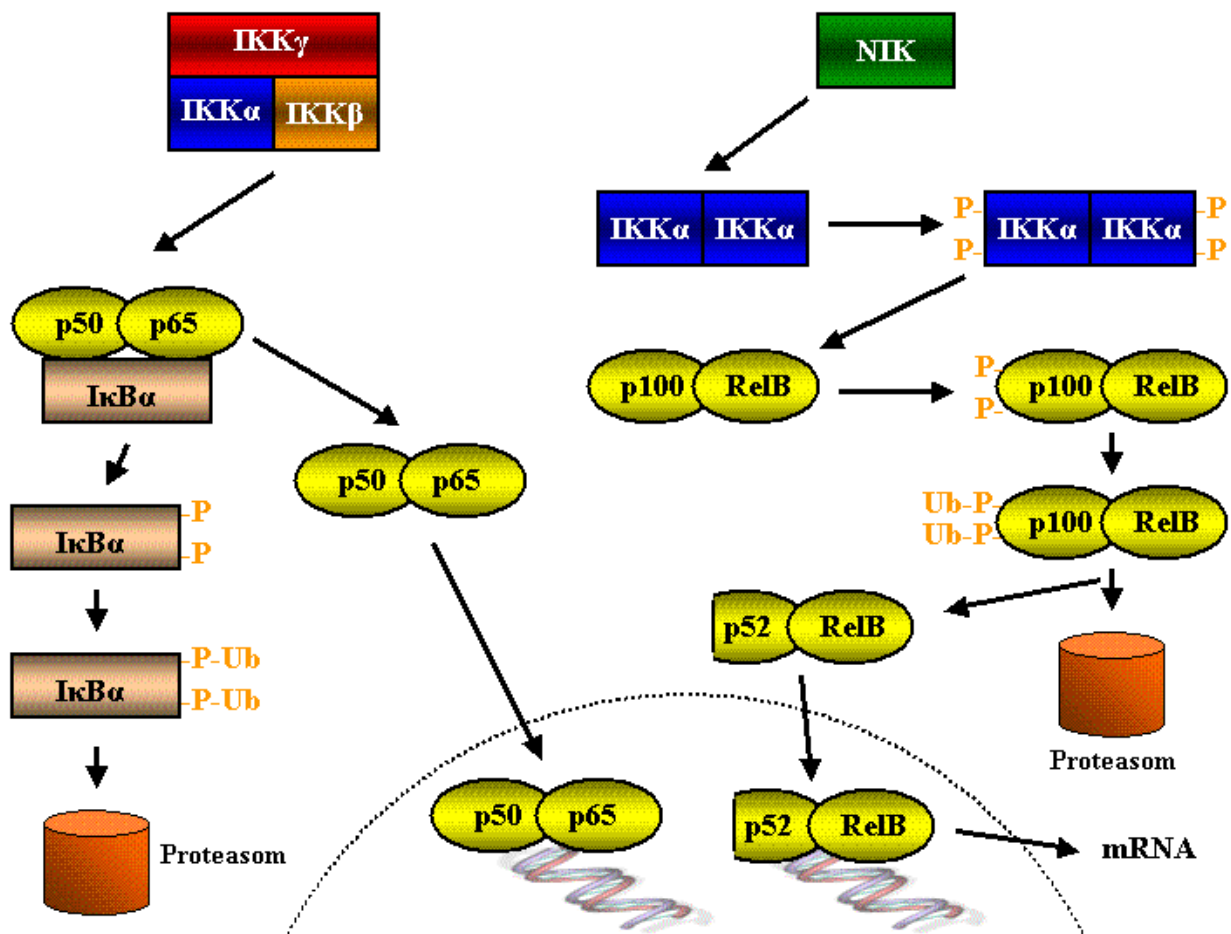


Abb.3 Klassische (links) und alternative (rechts) NFκB-Signaltransduktion

NFκB spielt innerhalb der Immunabwehr des Organismus eine zentrale Rolle, ist aber genauso für die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose von essentieller Bedeutung (Gosh *et al.*, 1998; Karin *et al.*, 2000). Die Familie der NFκB Transkriptionsfaktoren umfaßt die fünf Mitglieder p65/RelA, RelB, c-Rel, p50/NFκB1 und p52/NFκB2. Diese liegen als Homo- oder Heterodimere an Vertreter der IκB-Familie („Inhibitor of NFκB“) gebunden im Zytosol der Zelle vor. IκB-Proteine verfügen im N-terminalen Bereich über eine Kernexport-Domäne und verdecken, wenn sie an NFκB-Dimere gebunden sind, deren Kernlokalisations-Sequenzen und nehmen dadurch aktiv Einfluß auf Aufenthaltsort und Aktivitätsstatus des Transkriptionsfaktors (Huang *et al.*, 2000). Binden Zytokine wie z.B. Interleukin-1β oder TNFα als klassische NFκB-Aktivatoren an die entsprechenden Rezeptoren, oder sind Zellen physikalischen oder chemischen Stress ausgesetzt, kommt es vermittelt durch verschiedene Adapterproteine zu einer Aktivierung sogenannter IκB-Kinasen (IKKs). Als wichtigste Vertreter dieser Kinase-Familie sind IKKα, IKKβ und IKKγ, die auch als NEMO („NFκB essential modifier“) bezeichnet wird, zu nennen. Bei IKKα und IKKβ handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen, die zur IκB-Phosphorylierung in der Lage sind. NEMO verfügt nach derzeitigem Wissensstand über keine Kinaseaktivität, sondern vereinigt als stabilisierende Komponente IKKα und IKKβ zu einem Kinase-Komplex. Im Falle von IκBα bewirkt die Phosphorylierung der Serine 32 und 36 eine Polyubiquitinylierung, die den proteolytischen IκBα-Abbau durch das Proteasom einleitet (Gosh *et al.* 1998). Zuvor gebundenes und durch diesen Vorgang freigesetztes zytosolisches NFκB transloziert augenblicklich in den Nukleus und ist dort zur Bindung an entsprechende Promoter-Sequenzen in der Lage. Die Bindung von NFκB-Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden Konsensus-Sequenzen in der DNA löst die Formierung des transkriptionellen Apparates und nachfolgend die Expression von NFκB-Zielgenen aus. IκBα ist eines der durch NFκB-Aktivierung vermehrt exprimierten Proteine, sodaß unter physiologischen Bedingungen eine NFκB-Aktivierung gleichzeitig im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus zu einer Begrenzung der Genexpression durch NFκB führt. Die NFκB-Untereinheiten p50/NFκB1 und p65/RelA unterscheiden sich im wesentlichen durch das Fehlen einer Transaktivierungsdomäne in der p50/NFκB1-Aminosäure-Sequenz. Durch diesen Umstand ist p50/NFκB1 nur durch Heterodimer-Bildung zu einer Aktivierung der Genexpression in der Lage. p50/NFκB1-Homodimere sind deshalb transkriptionelle Repressoren (Schmitz *et al.*, 1991). Neben der zuvor beschriebenen klassischen NFκB-Signaltransduktion wird außerdem eine alternative NFκB-Aktivierung beschrieben, in der die

Familie der I $\kappa$ B-Proteine keine Rolle spielt. Bei dieser Art der Signalweitergabe kommt es aufgrund einer Ligand-Rezeptor-Interaktion und der nachfolgenden NIK-Aktivierung („NF $\kappa$ B-inducing Kinase“) zur Phosphorylierung eines IKK $\alpha$ -Homodimers (Xiao *et al.*, 2004). Substrat des aktivierten IKK $\alpha$ -Komplexes ist unter anderem die p52/NF $\kappa$ B2-Vorstufe p100, deren Reifung durch Phosphorylierung ausgelöst wird. Als heterodimerer Komplex, unter Beteiligung von RelB, transloziert p52/NF $\kappa$ B2 in den Kern und induziert die Transkription der entsprechenden Zielgene.

### 1.2.1.3 Die Familie der CCAAT/Enhancer-bindenden-Proteine

Die Familie der CCAAT/Enhancer-bindenden Proteine wird nach heutigem Wissensstand durch die sechs Vertreter C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ , C/EBP $\gamma$ , C/EBP $\epsilon$ , C/EBP $\zeta$  repräsentiert. Die C-terminale Aminosäure-Sequenz ist bei allen C/EBP-Isoformen zu 90% identisch (Ramji *et al.*, 2001). In diesem Bereich der Proteinsequenz ist die sog. basische „Leucin-Zipper-Domäne“ (bZIP) angesiedelt, die durch das Auftreten von vier bzw. fünf Leucinen im Abstand von sieben Aminosäuren sowie das Vorhandensein basischer Sequenzabschnitte charakterisiert ist und einen Bereich darstellt, der zur Protein-Protein-Interaktion fähig ist (Langschulz *et al.*, 1988 (I)). Die große Homologie in diesem Sequenzbereich hat zur Folge, daß alle C/EBP-Isoformen miteinander Homo- und Heterodimere ausbilden können. Die Dimerisierung wird als Voraussetzung für eine DNA-Bindung angesehen und ist damit für die transkriptionelle Aktivität der C/EBPs essentiell (Vinson *et al.*, 1989). Die Sequenzhomologie der C/EBP-Proteine im C-terminalen Bereich liegt bei ca. <20% (Ramji *et al.*, 2001). Allerdings liegen innerhalb des C-terminalen Sequenzbereiches die, zwischen den einzelnen Vertretern der Familie stark konservierten Transaktivierungsdomänen (Williams *et al.*, 1995; Cooper *et al.*, 1995). Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie spielen in einer Vielzahl von Zelltypen eine zentrale Rolle. Neben einer Beteiligung an der Adipozyten-Differenzierung (Darlington *et al.*, 1998) sind Vertreter der C/EBP-Familie für die Expression einer Reihe von am Fettstoffwechsel beteiligter Proteine verantwortlich (Wang *et al.*, 1995). Desweiteren spielen verschiedene C/EBP-Isoformen eine wichtige Rolle als Regulatoren der Hepatozyten-Proliferation (Timchenko *et al.*, 1997) und sind für verschiedene metabolische Prozesse in diesem Zelltyp von essentieller Bedeutung. Die Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie lassen sich nicht eindeutig einer bestimmten Signaltransduktionskaskade zuordnen, da ihre Beteiligung an der Expression einer Vielzahl von Genen in den unterschiedlichsten Geweben diskutiert wird. Eine erhöhte transkriptionelle Aktivität der C/EBPs kann sowohl durch ihre

modifizierte Expression als auch durch posttranskriptionelle Modifikationen wie Phosphorylierung (Buck *et al.*, 1999) und Protein-Protein-Interaktion (LeClair *et al.*, 1992) ausgelöst werden. Posttranskriptionelle und posttranslationelle Veränderungen der C/EBP-Proteine führen i. d. R. zu einer modifizierten DNA-Bindungsaffinität und beeinflussen somit die transkriptionelle Aktivität. Eine Reihe von Serin-Threonin-Kinasen werden als potentielle Aktivatoren der C/EBPs diskutiert, ebenso wie eine Vielzahl unterschiedlichster Transkriptionsfaktoren als potentielle Interaktionspartner beschrieben wurden, die an dieser Stelle aber nicht diskutiert werden können (siehe Übersichtsartikel von Ramji *et al.*, 2002).

### 1.2.2 Akute Phase Proteine

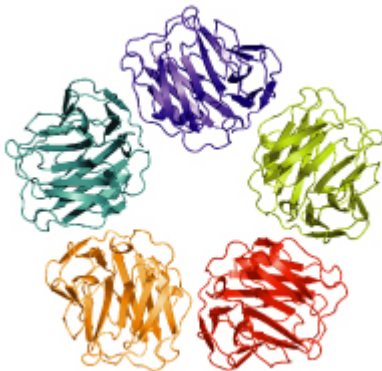
Per Definition gelten als APP solche Faktoren, deren Plasmaspiegel während eines entzündlichen Prozesses um mindestens 25 % ansteigt oder abfällt (Morley *et al.*, 1982). Erstere zählen zu der Gruppe der positiven APP, letztere werden als negative APP bezeichnet. Als wichtiges Unterscheidungskriterium verschiedener APPs dient, ob es sich um sezernierte oder interzelluläre Proteine handelt. Klassische APP sind Komplement-Faktoren, Proteine des koagulatorischen- bzw. fibrinolytischen Systems sowie Transporter-proteine und Agentien der unspezifischen Immunabwehr. Werden intrazelluläre Proteine wie Transkriptionsfaktoren, intrazelluläre Enzyme oder Rezeptoren im Verlauf der APR vermehrt oder in verringertem Maße exprimiert, spricht man von Akute Phase regulierten intra-zellulären Proteinen, sog. APRIPs (Olivier *et al.*, 1999). Desweiteren werden Akute Phase Proteine abhängig vom Stimulus, der ihre Expression induziert, nach Typ-1 oder Typ-2 Proteinen klassifiziert. Für die Expression von Typ-1 Akute Phase Proteine ist die Aktivierung von Interleukin-1 $\beta$ -induzierbaren Signalwegen notwendig, während Typ-2 APPs vorwiegend IL-6-abhängig sind (Baumann *et al.*, 1994). Der früheste Zeitpunkt, zu dem die veränderte Proteinsynthese nach Auftreten des inflammatorischen Stimulus nachweisbar ist, dient der Unterscheidung in frühe ( $\leq 12$  Stunden) oder späte ( $\geq 12$  Stunden) APPs. Zusätzlich wird abhängig vom Ausmaß der vermehrten Expression im Vergleich zum Normalzustand zwischen starken (2-1000-fach) und schwachen (1,5-2-fach) APPs unterschieden (Ruminy *et al.*, 2001). Die unterschiedlichen Klassifizierungen der Akute Phase Proteine wurde in **Tabelle 2** zusammengefaßt.

**Tab.2 Klassifizierung der Akuten Phase Proteine.**

<b>Typ-1</b>	<b>Typ2</b>	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	<b>früh</b>	<b>spät</b>	<b>APP</b>	<b>APRIP</b>	<b>schwach</b>	<b>stark</b>
IL-1 $\beta$ - induzier- bar	IL-6- induzier- bar	25% verstärkte Expression	25% geringere Expression	Expression innerhalb 12 h	Expression später als nach 12h	Sezernierte Proteine	Intra- zelluläre Proteine	1,5-2x	2 - 1000x

### 1.2.2.1 C-reaktives Protein

Humanes C-reaktives Protein (CRP) ist der Prototyp eines Akute Phase Proteins (Mortensen *et al.*, 2001). Es handelt sich um ein 105 kDa großes Protein, das aus fünf identischen Untereinheiten besteht, die sich zu einer planaren, pentameren Struktur vereinigen.



**Abb.4**  
**C-reaktives Protein.**  
**Fünf identische Untereinheiten sind nichtkovalent zu einer planaren pentameren Struktur verknüpft.**

Hauptsyntheseort des CRP sind die Hepatozyten. Vereinzelt beschriebene Syntheseorte, wie Glattmuskelzellen (Calabro *et al.* 2003), die atherosklerotische Plaque (Jabs *et al.* 2003), Pankreas (Fehsel *et al.* 1997) und die Niere (Jabs *et al.* 2003) spielen für die Ausprägung hoher Plasmaspiegel, wie sie im Verlaufe der APR auftreten, nur eine untergeordnete Rolle. Die von Tillet *et al.* im Jahre 1930 beschriebene Fähigkeit dieses Proteins, mit dem Zellwand C-Polysaccharid von *Streptococcus pneumoniae* zu interagieren, ist verantwortlich für die Namensgebung und gibt erste Hinweise auf die Funktion des CRPs im Organismus. Beim Vorliegen einer bakteriellen oder viralen Infektion oder der Besiedelung des Organismus mit Pilzen führt die Affinität zwischen CRP und Phosphocholinresten verschiedener Strukturen der Erreger zu einer Aggregation beider Komponenten und einer Opsonisierung der Fremdpartikel durch Aktivierung des Komplement-Systems (Volanakis *et al.*, 1982). Unspezifische IgG-Rezeptoren der Leukozyten-Oberfläche, sog. Fc $\gamma$ IIa-Rezeptoren, binden CRP-markierte Strukturen (Manolov *et al.*, 2004) und leiten deren Phagozytose ein. Neben der Bindung von Partikeln mikrobiologischen Ursprungs konnte auch eine Affinität zu LDL- und VLDL-Partikeln (de Beer *et al.*, 1982) sowie zu deren oxidierten Formen belegt werden (Chang *et al.*, 2002). Aufgrund dieser funktionellen Charakteristika scheint die CRP-Expression Bestandteil der Abwehr bakterieller, viraler und mykotischer

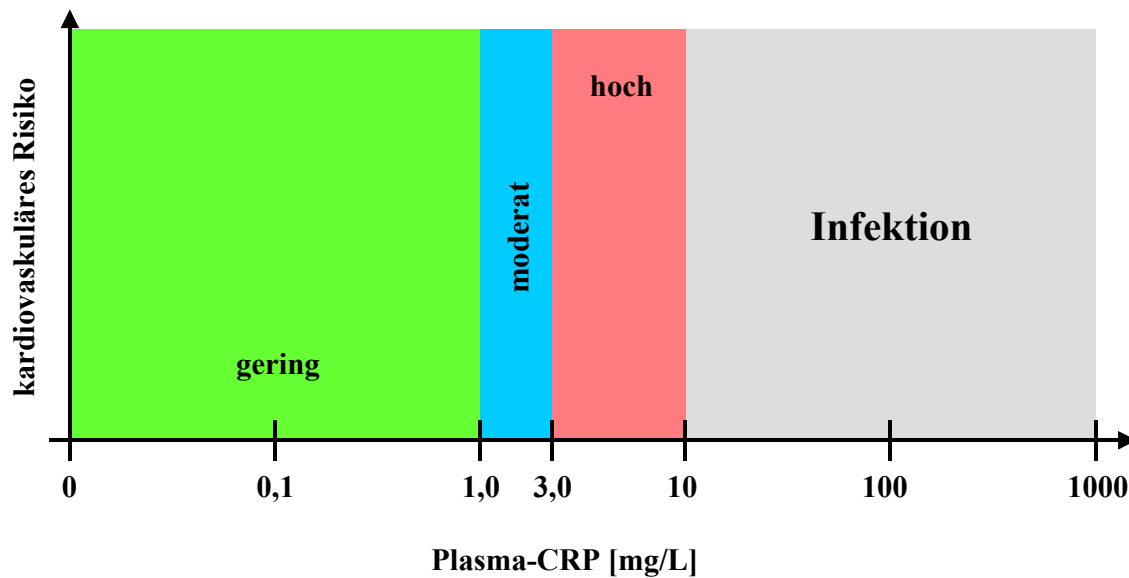
Infektionen zu sein. Gestützt wird diese These durch den Befund, daß human-CRP-transgene Mäuse vor Infektionen durch *Streptococcus pneumoniae* ebenso geschützt sind (Szalai *et al.*, 1995) wie Mäuse, die zuvor durch eine einmalige Injektion mit humanem CRP behandelt wurden (Mold *et al.*, 1981).

Zusätzlich ist belegt, daß CRP an der Eliminierung verletzter Zellen beteiligt ist. Die Beschädigung einer Zelle führt zur Präsentation intrazellulärer Membranbestandteile an der Zelloberfläche, was eine Bindung von CRP-Molekülen ermöglicht. Dieser Vorgang löst die Aktivierung des Komplement-Systems und die Freisetzung chemotaktischer Agentien aus, was die Phagozytose der beschädigten Zellen durch Leukozyten zur Folge hat (Hack *et al.*, 1997).

Die Rolle, die CRP bei der Abwehr bakterieller Infektionen spielt, sowie die Tatsache, daß Plasma CRP-Spiegel bereits kurz nach erfolgter Infektion rasch ansteigen, hat dazu geführt, daß CRP ein wichtiger Biomarker zur Diagnose versteckter Infektionen geworden ist. Zusätzlich hat sich gezeigt, daß eine Assoziation zwischen erhöhten Plasma CRP-Spiegeln und dem Vorliegen kardiovaskulärer Erkrankungen besteht. So läßt sich anhand der CRP-Plasma-Konzentration das zukünftige kardiovaskuläre Risiko von *Angina pectoris* Patienten abschätzen (Haverkate *et al.*, 1997). Desweiteren weisen Studien an großen Probandenpopulationen darauf hin, daß erhöhte CRP-Spiegel bei männlichen Personen mit einem gesteigerten zukünftigen Risiko, eine koronare Herzkrankheit auszuprägen, assoziiert sind (Koenig *et al.*, 1999). Weitere Studien konnten belegen, daß die Beurteilung der Kombination aus CRP- und LDL-Plasmakonzentration eine größere prädiktive Aussagekraft in bezug auf das zukünftige kardiovaskuläre Risiko haben als die isolierte Betrachtung des LDL-Spiegels (Ridger *et al.*, 2000). Auch wenn einige Patientenkollektive keine Relation zwischen CRP-Expression und kardiovaskulärem Risiko widerspiegeln (Danesh *et al.*, 2004), hat sich dennoch zur Beurteilung verschiedener CRP-Plasma-Konzentrationen folgende Einteilung in drei Risikoklassen durchgesetzt: Geringes kardiovaskuläres Risiko wird mit CRP-Konzentrationen von <1 mg/L assoziiert. Ein leichtes bis moderates Risiko liegt bei Patienten mit Plasmaspiegeln zwischen 1 mg/L und 3 mg/L vor. CRP-Konzentrationen von >3 mg/L bis 10 mg/L werden mit einem hohen kardiovaskulären Risiko in Zusammenhang gebracht. Patienten, bei denen Plasmakonzentrationen von >3 mg/L diagnostiziert werden, unterliegen einem ca. 2-fach höheren kardiovaskulären Risiko als Patienten mit CRP-Plasmaspiegeln von <1 mg/L. Plasmaspiegel oberhalb der Grenze von 10 mg/L deuten auf das Vorliegen einer



mikrobiellen Infektion hin und haben keinerlei Aussagekraft, hinsichtlich der prädiktiven Risikoabschätzung in bezug auf Herz-Kreislauf-erkrankungen (Pearson *et al.*, 2003).



**Abb.5 Assoziation der CRP-Plasmakonzentration mit dem kardiovaskulären Risiko (Erläuterung s. Text)**

Neben antimikrobiellen Eigenschaften und der Funktion als Marker, der das Vorliegen inflammatorische Prozesse und kardiovaskulärer Risiken anzeigt, verfügt CRP auch über direkte proatherogene Wirkungen. CRP fördert eine verstärkte LDL-Aufnahme durch Makrophagen (Zwaka *et al.*, 2001), aktiviert das Komplement-System in atherosklerotischen Läsionen, führt in Endothelzellen zur Expression chemotaktischer Agentien (Pasceri *et al.*, 2001) und induziert die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle (Pasceri *et al.*, 2000). Problematisch in bezug auf die Verlässlichkeit dieser Daten ist anzusehen, daß in allen vorliegenden Studien kommerziell erhältliches CRP zum Einsatz kam, das unter Umständen Kontaminationen mit LPS und Azid, enthielt und sich damit die beobachteten Effekte nicht eindeutig auf Wirkungen des CRPs zurückführen lassen. So ließen sich eine Vielzahl vorgelegter Ergebnisse unter Verwendung hochaufgereinigten CRPs nicht reproduzieren (Taylor *et al.*, 2005). Weitere widersprüchliche Daten im Hinblick auf die proatherogene Rolle von CRP lieferten auch Studien an human-CRP transgenen Apo-E(-/-)-Mäusen. So ließ sich in einer Untersuchung unter hypercholesterolämischen Bedingungen eine beschleunigte Atherosklerose der Aorta der Tiere nachweisen (Paul *et al.*, 2004), wohingegen eine zweite Studie weder proatherogene noch atheroprotektive Effekte des Transgens zeigte (Hirschfeld *et*

al., 2005). Eine abschließende Bewertung des proatherogenen Potentials des C-reaktiven Proteins scheint anhand der vorliegenden Daten momentan nicht möglich.

### **1.3 Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mechanismen aufzuklären, die im Rahmen inflammatorischer Erkrankungen zur Expression sogenannter Akute Phase Proteine führen. Der Fokus lag hierbei auf der Untersuchung von Signaltransduktionkaskaden, die aktiviert durch proinflammatorische Zytokine in der Leber die Bildung proatherogener Plasmaproteine wie C-reaktives Protein zur Folge haben. Zu diesem Zweck sollten verschiedene *in vitro* Zellmodelle etabliert und evaluiert werden. Neben Genexpressionsanalysen in zytokin-stimulierten primären humanen Hepatozyten, sowie in den Hepatoma-Zelllinien HepG2 und Hep3B sollte die Manipulation der CRP-Expression durch gezielten Gentransfer und die Anwendung der siRNA-Technologie im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen. Zu diesem Zweck sollten Transkriptionsfaktoren der NF $\kappa$ B-Familie, sowie der Familie der „Signal transducer and activator of transcription“ (STAT) und der CCAAT/Enhancer-bindenden Proteine (C/EBP) überexprimiert werden, bzw. deren Expression durch die Transfektion mit entsprechenden siRNA-Oligonukleotide gehemmt werden.

Ein weiteres wichtiges Ziel war es, ein zelluläres Modellsystem zu generieren und zu charakterisieren, das zur Identifizierung von Substanzen geeignet ist, die die CRP-Expression modulieren oder inhibieren.

## **2 Materialien und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 HepG2- und Hep3B-Zellen**

Die Hepatoma-Zelllinien HepG2- und Hep3B-Zellen wurden in Iscoves Medium supplementiert mit 1% Penicillin / Streptomycin und 10% FKS in Kollagen-I-beschichteten Gefäßen kultiviert.

<b>Produkt</b>	<b>Synonym</b>	<b>Lieferant</b>	<b>Best.-Nr</b>
Accutase, sterile filtriert		PAA Laboratories	L11-007
Iscove Liquid Media		Linaris Biologische Produkte	GMF2424YK
Dulbecco's Phosphate Buffer	PBS	Linaris Biologische Produkte	GBF1622YK
Penicillin-Streptomycin		Gibco, Invitrogen Corporation	15140-122
Foetal Bovine Serum	FKS	Gibco, Invitrogen Corporation	10270-106
75cm <sup>2</sup> Vented Flask; Collagen-I-Cellware	Zellkulturflasche 75cm <sup>2</sup>	Becton Dickinson Labware	356485
150cm <sup>2</sup> Vented Flask; Collagen-I-Cellware	Zellkulturflasche 150cm <sup>2</sup>	Becton Dickinson Labware	356486
96-Well Plate; Collagen-I-Cellware	96 Kavitäten Platte	Becton Dickinson Labware	356407
24-Well Plate; Collagen-I-Cellware	24 Kavitäten Platte	Becton Dickinson Labware	356408

#### **2.1.2 Primäre humane Hepatozyten**

Primäre humane Hepotocyten wurden kryopreserviert von der Firma Cytonet (Weinheim, Deutschland) bezogen und in supplementiertem Hepatozyten Basal Medium (HBM) auf Kollagen-I-beschichteten Kulturgefäßen ausplattiert.

<b>Produkt</b>	<b>Synonym</b>	<b>Lieferant</b>	<b>Best.-Nr</b>
Hepatozyten Basal Medium	HBM	Cambrex Bioproducts	CC-3199
HCM Single Quots	HBM Supplemente	Cambrex Bioproducts	CC-4182

## 2.2 Reporter-Gen-Assays

### 2.2.1 Herstellung eines CRP-Luciferase-Reporter-Gen-Assays

#### 2.2.1.1 Klonierung eines humanen CRP-Promoter-Luciferase Konstruktes

Ein Fragment des humanen CRP-Promoters (-1005 bp bis +12bp) (ENSG00000132693) wurde PCR-basiert aus genomischer DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) isoliert und amplifiziert. Hierbei kamen folgende Primer zum Einsatz: Sense: 5'-GTAAGATTGACAGACAGTGTGGAG-3', Antisense: 5'-GGCTAGAAGTCCTAGATCTCTTGC-3'. Das Promoter-Fragment wurde an den KpnI-XhoI Schnittstellen in das pGL3-BASIC<sup>®</sup> Vektor-Plasmid eingefügt. Die ordnungsgemäße Orientierung des PCR-Fragmentes im Trägerplasmid wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Produkt	Synonym	Hersteller	Bestell-Nr.
Taq PCR Master Mix Kit		Qiagen	201443
pGL3-Basic <sup>®</sup> Vektor	Luciferase Reporter Vektor	Promega	E1751
XhoI	Restriktionsenzym	New England Biolabs	R0146S
KpnI	Restriktionsenzym	New England Biolabs	R0142S

#### 2.2.1.2 Stabile Transfektion des CRP-Luciferase-Reporters

HepG2-Zellen wurden mit dem p1000/CRP/Luciferase-Reporter-Konstrukt und pcDNA3.1 mittels Lipofectamine 2000<sup>®</sup> kotransfiziert. Positiv transfizierte Klone wurden durch Kultivierung der Zellen in Standardmedium mit einem Zusatz von 1 mg/mL G418 nach 18 Tagen isoliert. Die Population eines Klones mit Interleukin-6-induzierbarer Reporteraktivität wurde vermehrt und für nachfolgende Experimente eingesetzt. Eine mögliche unterschiedliche Induzierbarkeit weiterer positiver Klone, wurde durch parallele Testung einer zweiten Zelllinie überprüft und lag nicht vor.

Produkt	Synonym	Lieferant	Best.-Nr
Lipofectamine 2000 <sup>®</sup> Reagent	LF2000	Invitrogen Life Technologies	11668-019
G418 Solution; 50mg/mL	Selektionsantibiotikum	PAA Laboratories GmbH	P11-012
pcDNA3.1	Leervector	Invitrogen Life Technologies	K4800-01

### 2.2.2 Luciferase-Reporter-Gen-Assay

Die Luciferase-Reporter-Assays wurden mit dem Bright-Glo<sup>®</sup> Luciferase-Assay-System der Firma Promega (Madison, USA) durchgeführt. Nach entsprechender Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 50 µL Lyse-Puffer versetzt und das Lysat anschließend mit 50µL Substrat inkubiert. Nach 60 sec. erfolgte die Lumineszenz-Messung in einem Lumistar-Mikrotiterplatten-Lesegerät der Firma BMG.

Produkt	Lieferant	Best.-Nr
Bright-Glo <sup>®</sup> Luciferase-Assay-System	Promega	E2620

## 2.3 Genexpressionsanalysen auf mRNA-Ebene

### 2.3.1 Isolation der Gesamt-RNA aus Zellkulturproben

Unter Verwendung des RNeasy-Kits von Qiagen bzw. dem Einsatz des BIOROBOT 8000 der Firma Qiagen wurde aus primären humanen Hepatozyten, aus HepG2-Zellen und aus Hep3B-Zellen Gesamt-RNA entsprechend der Herstellerprotokolle isoliert. Der Verdau möglicher DNA-Kontaminationen erfolgte unter Zuhilfenahme des RNase-free DNase-Kits der Firma Qiagen. Qualität und Menge der isolierten RNA wurde mittels Kapillarelektrophorese am Agilent 2100 Bioanalyser bestimmt.

Produkt	Lieferant	Best.-Nr
RNeasy <sup>®</sup> -Kit	Qiagen	74106
RNase-free <sup>®</sup> DNase-Set	Qiagen	79254
RNA 6000 Nano <sup>®</sup> Kit	Agilent Technologies	5065-4476

### 2.3.2 Quantitative Reverse Transkriptase-PCR in Echtzeit

Genexpressionsanalysen auf mRNA-Ebene wurden mittels der quantitativen Reversen Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) im sogenannten „One-Step“-Verfahren durchgeführt. Nach der reversen Transkription der mRNA erfolgte die Detektion amplifizierter DNA in Echtzeit mittels sequenzspezifischer fluoreszenzmarkierter Oligonukleotid-Sonden, sog. TaqMan<sup>®</sup>-Sonden. Das Verfahren wurde soweit optimiert, daß eine Detektion der akkumulierenden DNA von Zielgen und Kontrollgen (GAPDH) durch unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungen der Sonden gleichzeitig erfolgen konnte. Man spricht in diesem Zusammenhang von einer Multiplex-PCR. Die Linearität der Amplifikation innerhalb der Multiplex-Reaktion wurde für beide detektierten Gene durch

Verdünnungsreihen der eingesetzten mRNA überprüft und war gewährleistet. Mittels Kapillarelektrophorese wurden das PCR-Endprodukte überprüft und bestätigt, daß es zu keiner Amplifikation weiterer DNA-Fragmente außer der gewünschten kam. Die relative Expression des Zielgens wurde gegen die GAPDH-Expression normalisiert und basierend auf der  $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode berechnet (Heid *et al.*, 1996). Die PCR-Reaktionen wurden im 96-Kavitäten Format im Volumen von 20  $\mu\text{L}$  unter Verwendung des RT-Probe QuantiTect<sup>®</sup> Probe RT-PCR-Kits<sup>®</sup> der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Pro Reaktion kamen zum Einsatz: 10,0  $\mu\text{L}$  QuantiTect<sup>®</sup> Probe Mix, 1,0  $\mu\text{L}$  TaqMan<sup>®</sup>-Sonde Zielgen, 1,0  $\mu\text{L}$  TaqMan<sup>®</sup>-Sonde Kontrollgen, 0,2  $\mu\text{L}$  RT-Probe Enzym-Mix. Verwendete TaqMan<sup>®</sup>-Sonden (TaqMan<sup>®</sup>-Gene-expression-assay) wurden von der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) bezogen. Die PCR-Reaktionen erfolgte im Thermoelement iCycler<sup>®</sup> der BioRad-Laboratories GmbH (München, Deutschland) unter Verwendung folgenden Protokolls:

<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Phase</u>
40 min.	50° C	} Reverse Transkription (1x)
4 min.	95° C	
15 sec.	94° C	} Amplifikation (45x)
1 min.	60° C	
unendlich	4° C	PCR-Produkt-Lagerung

Produkt	Lieferant	Best.-Nr
QuantiTect <sup>®</sup> Probe RT-PCR Kit	Qiagen	204445

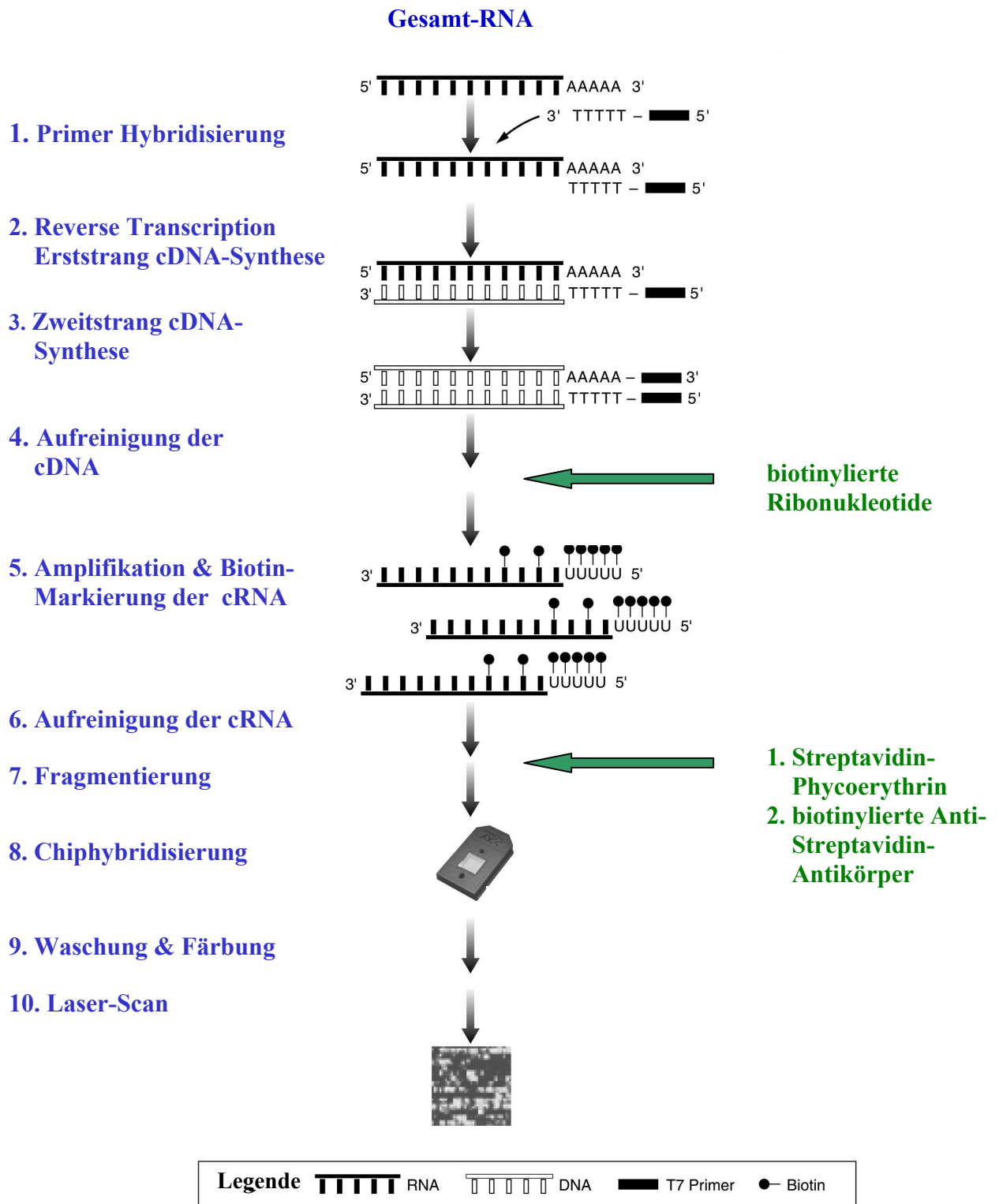
Gen Symbol	Sondensequenz	Applera Best.-Nr.
CCL5	CCAACCCAGCAGTCGTCTTTGTCAC	Hs00174575_m1
C/EBPA	.ATCGTGCCTTGTCATTTTATTTG	Hs00269972_s1
C/EBPB	G1GATATCGCAGATGACGGCTGCCC	Hs00942496_s1
C/EBPD	TGGCGCAGCCAGAGCCGCCGGGTGC	Hs00270931_s1
CRP	TTTGCCAGACAGACATGTCGAGGA	Hs00265044_m1
CXCL10	GGCATTCAAGGAGTACCTCTCTCTA	Hs00171042_m1
EHF	AGTGGAACGGCCAGTGCAGTAGTGA	Hs00171917_m1
FGB	CGACAATGAGGAGGGTTTCTTCAGT	Hs00170586_m1
gp130	CAAAGTTTGCTCAAGGAGAAATTGA	Hs00174360_m1
HAMP	TTCCCACAACAGACGGGACAACCTTG	Hs00221783_m1
HP	CGGATATCGCAGATGACGGCTGCCC	Hs00605928_g1
NFKBIA	CGGGGACTCGTTCTCCTGCACTTGGCC	Hs00153283_m1
IL-6	GATTCAATGAGGAGACTTGCCTGGT	Hs00174131_m1

IL-6R	GACAAGCCTCCCAGTGCAAGATTCT	Hs00169842 ml
IL-8	GTGTGAAGGTGCAGTTTTGCCAAGG	Hs00174103 ml
JAK1	CCCAAGCCCCGAGAAATCTCCAACC	Hs00233820 ml
JAK2	ACCAGCGGAATTTATGCGTATGATT	Hs00234567 ml
JAK3	CTGCCCTGCTGAGGTTACGAGCTC	Hs00169663 ml
LCN2	TCCTGTTTAGGAAAAAGAAGTGTGA	Hs00194353 ml
LBP	CTGCAGTATGCGGCCCAGGAGGGGC	Hs00188074 ml
LTB	ATCAGGGAGGACTGGTAACGGAGAC	Hs00242737 ml
NFKBIZ	CAGATGGTGACACGTTCCATCATAT	Hs00230071 ml
PIAS3	CTCGCGGGCACTGATCAAGGAGAAA	Hs00180666 ml
SAA2	AGGAGACCTGGCTATGAGGCCCTCG	Hs00763479 sl
SOCS3	AGCTGGTGGTGAACGCAGTGCGCAA	Hs00269575 sl
STAT3	AGCCAATTGTGATGCTTCCCTGATT	Hs00374280 ml

### 2.3.3 Globale Genexpressionsanalyse mittels cDNA-Microarrays

Für die Hybridisierung von cDNA-Mikrochips wurde aus entsprechend behandelten Zellen Gesamt-RNA isoliert und diese in einem mehrere Schritte umfassenden Verfahren in fragmentierte cRNA überführt (**Abb.6**). Hierbei wurde zunächst in einer Reversen-Transkriptase Reaktion die Proben-RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben, die als Basis für die Herstellung doppelsträngiger DNA diente. Die erhaltene DNA wurde durch Festphasen-Extraktion aufgereinigt und durch *in vitro*-Transkription (IVT) erneut in cRNA überführt. Bei diesem Schritt wurde die cRNA durch Verwendung biotinylierter Ribonukleotide markiert. Desweiteren führt die IVT-Reaktion zu einer Vervielfältigung der Probenmaterialmenge um den Faktor 30-100 (Lipschutz *et al.*, 1999). Das IVT-Produkt wurde erneut durch Festphasen-Extraktion aufgereinigt und vor Aufbringen auf den Mikrochip enzymatisch fragmentiert. Bei allen Arbeitsschritten inklusive der Chiphybridisierung und Färbung in der Affymetrix-Gene-Chip-Fluidics-Station400<sup>®</sup> sowie dem Laser-Scan im Affymetrix-Gene-Chip-Scanner3000<sup>®</sup> wurde das von Affymetrix vorgeschlagene Protokoll angewandt (Gene Chip Expression Analysis Technical Manual; Affymetrix USA). Die Auswertung der Chipdaten wurde unter Verwendung der Rosetta-Resolver<sup>®</sup> Software 5.0 der Firma Rosetta Inpharmatics LLC Biosoftware, (Seattle, USA) durchgeführt.

Produkt	Lieferant	Best.-Nr
Gene Chip Sample Cleanup Module	Affymetrix	900371
Enzo's Bio Array RNA Transcript labelling Kit	Enzo Diagnostics	900182
T7 RNA-Polymerase	Stratagene	600123
Human Genome U133 Plus 2.0 Chips	Affymetrix	900470



**Abb.6 Genexpressionsanalyse durch cDNA-Microarrays.**  
Aufbereitung des Probenmaterials, Chiphybridisierung und Chipanalyse in der Übersicht



## 2.4 Genexpressionsanalyse auf Protein-Ebene

### 2.4.1 SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse

Nach Aussaat der Zellen und Behandlung im 24-Kavitäten Format sowie zweimaliger Waschung mit PBS wurde eine Zellyse mit zweifachkonzentriertem Lämmli-Puffer durchgeführt. Nach fünfminütigen Erhitzen auf 95 Grad Celsius wurden 15 µL des Zell-Lysates auf Novex Tris–Glycin 8-16 % Gradient Gele aufgetragen und anschließend in TGS-Puffer bei 120 V im elektrischen Feld in einzelne Proteinfractionen aufgetrennt. Zur vergleichenden Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine diente ein farbiger Proteinmarker. Im Anschluß an die Gelelektrophorese wurde ein Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran durchgeführt (methanolischer Nu-Page Transfer-Puffer). Nach Absättigung der unspezifischen Proteinbindungsstellen der Membranen in Block-Puffer (5 % Milchpulver, 0,2 % Tween-20<sup>®</sup> in TBS) wurden diese mit primärem Antikörper (1: 200-1:500 in Block-Puffer) bei 4 Grad Celsius unter leichtem schütteln für 12 h inkubiert. Nach Waschung mit Blocking-Puffer erfolgte die Inkubation der Membran mit dem zweiten HRP-konjugierten Antikörper (1:1000-1:6000 in Block-Puffer) für 1h. Im Anschluss daran wurden die Membranen mehrmals mit PBS gespült, mit SuperSignal<sup>®</sup>West Pico Chemolumineszenz Substrat für fünf Minuten benetzt und anschließend der Detektion mittels Hyperfilm<sup>®</sup> Chemilumineszenzfilm unterzogen.

Produkt	Synonym	Hersteller	Bestell-Nr.
SuperSignal <sup>®</sup> West Pico Chemilumineszenz Substrat	HRP-Substrat	Pierce, Perbio	#34080
10x Tris-Buffered Saline	10x TBS	Bio-Rad	#170-6435
Hyperfilm <sup>®</sup> High Performance Chemilumineszenz Filme		Amersham Bioscience	RPN3103K
Nitrocellulose Membrane Filter Paper Sandwich; 0,45µm		Invitrogen	LC2001
Milchpulver		Roth GmbH	T145.2
Novex <sup>®</sup> TrisGly Transfer Buffer 25x	Transfer Puffer	Invitrogen	LC3675
TWEEN 20 <sup>®</sup>		Sigma-Aldrich	P-1379
10x Tris/Glycin/SDS Buffer	10x TGS	Bio-Rad	#161-0772
Kaleidoscope <sup>®</sup> Prestained Standards	Protein-marker	Bio-Rad	#161-0324
8-16% Tris-Glycine Gel; 1,0mm x 12well	SDS-Gele	Invitrogen	EC60452BOX
Laemmli Sample Buffer; 2x Concentrate	Lysis Puffer	Sigma-Aldrich	S-3401
Goat anti-rabbit IgG-HRP	anti-Kannin- chen Antikörper	Santa Cruz Biotechnology	sc-2004
Goat anti-mouse IgG-HRP	Sekundär anti- Maus-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology	sc-2005

### 2.4.2 “Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay” / ELISA

Zellkulturüberstände von behandelten und nichtbehandelten primären humanen Hepatozyten wurden 1:10 verdünnt und als Probenmaterial eingesetzt. Zur Konzentrationsbestimmung des sezernierten CRPs wurde der CRP-ELISA (IMUCLONE CRP (hs)<sup>®</sup> der Firma American Diagnostics entsprechend den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt. Zur Bestimmung der IL-8 Konzentration in Zellkulturüberständen diente das Biotrak<sup>®</sup> ELISA-System.

Produkt	Hersteller	Bestell-Nr.
Imuclone <sup>®</sup> CRP ELISA Kit (HS)	American Diagnostics	#660
IL-8, human Biotrak <sup>®</sup> Easy ELISA	GE Healthcare	RPN5969

### 2.4.3 Immunohistochemische Bestimmung

Zu untersuchende Zellen wurden in kollagen-I-beschichteten Borosilikat-4-Kammer Kulturgefäßen ausplattiert, mit entsprechenden Zytokinen behandelt bzw. plasmidtransfiziert, PBS-gewaschen und mit 3% Formaldehydlösung für 20 Minuten fixiert. Nach 7-minütiger Permeabilisierung mittels 0,5% Triton-X100 Lösung und Absättigen unspezifischer Proteinbindungsstellen mittels Superblock<sup>®</sup> + 0,2 % Tween-20<sup>®</sup>, wurde das Präparat mit primärem Antikörper (1:50) bei 4 Grad Celsius unter leichtem Schütteln für 12 Stunden inkubiert. Nach intensivem Waschen mit Superblock<sup>®</sup> erfolgte die Hybridisierung mit dem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper (1:100) für 1 Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Anschließend Fotodetektion erfolgte am Nikon Eclipse<sup>®</sup> Mikroskop bei 60-facher Vergrößerung.

Produkt	Synonym	Hersteller	Bestell-Nr.
Borosilikat Coverglass		Lab-Tek, Nalge Nunc	155383
Formaldehyd 37 %		Sigma Aldrich	F-1635
Triton-X100		Sigma Aldrich	T-9284
Superblock <sup>®</sup> Blocking Buffer in PBS		Pierce, Perbio	#37515
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 goat anti rabbit IgG	fluoreszenzmarkierte Ziege-anti-Kanninchen Antikörper	Molecular Probes	A-11008
Alexa Fluor <sup>®</sup> 594 goat anti rabbit IgG	fluoreszenzmarkierte Ziege-anti-Kanninchen Antikörper	Molecular Probes	A-11012
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 goat anti rabbit IgG	fluoreszenzmarkierte Ziege-anti-Maus Antikörper	Molecular Probes	A-11001

## 2.5 Gentransfer und siRNA-Transfektion

### 2.5.1 Liposomale Plasmid Transfektion

Hep3B-Zellen wurden in kollagen-I-beschichteten 96-Kavitäten-Platten ausplattiert und in mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin supplementierten ISCOVES-Medium für 24 Stunden kultiviert. Die Plasmidtransfektion mittels Lipofectamine 2000<sup>®</sup> erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers in antibiotikafreien Medium. Pro Kavität kamen 0,5 µg Lipofectamin 2000<sup>®</sup> und 0,1 µg Plasmid-DNA zum Einsatz.

### 2.5.2 Adenoviraler Gentransfer

Adenovirales dominant-negatives IκBα und adenovirales GFP, wurde nach dem Standardprotokoll für die Herstellung rekombinanter Adenoviren hergestellt und in HEK-293-Zellen amplifiziert. Die effektivste und nicht toxische Viruspartikelmenge wurde durch die Infektion von Hep3B-Zellen mit unterschiedlichen Verdünnungen der Virus-Stammlösung austitriert.

Primäre humane Hepatozyten bzw. Hep3B-Zellen wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen / Kavität in Kollagen-I-beschichtete 24 Kavitäten Zellkulturplatten ausgesät und 96 Stunden danach mit der entsprechenden Menge adenoviralem dominant-negativen IκBα bzw. mit adenoviralem GFP infiziert. 24 Stunden nach Zugabe der Viruspartikel wurde das Kulturmedium gewechselt, bevor die Zellen weitere 24 Stunden unbehandelt blieben. Im Anschluss erfolgte die Stimulation mit den entsprechenden Zytokinen.

### 2.5.3 siRNA-Technologie

In den vergangenen Jahren hat die Möglichkeit, mittels sogenannter small-interferenceRNA-Technologie gezielt *in vitro* die Expression von Proteinen zu unterdrücken, stark an Bedeutung gewonnen. Im folgenden Abschnitt soll eine kurze Übersicht über das Prinzip dieser molekularbiologischen Methode sowie deren Möglichkeiten und Limitierungen gegeben werden. Der Methodik des spezifische Ausschaltens der Expression einzelner Proteine liegt die Beobachtung zugrunde, daß eukaryotische Zellen (und das gilt für nahezu alle bisher untersuchten Organismen) über Mechanismen verfügen, die es ihnen ermöglichen, einer viralen Invasion oder der Gefahr durch transponierende Genabschnitte entgegenzutreten (Bass *et al.*, 2000; Cogoni *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). Bei der Erkennung langer doppelsträngiger RNA viralen oder endogenen Ursprungs wird im Zytosol der Zelle eine umfangreiche Reaktionskaskade aktiviert in deren Verlauf Multiproteinkomplexe die

verschiedensten Effekte vermitteln. Hierbei kommt es zunächst durch das RNase-III-ähnliche Protein Dicer unter ATP-Verbrauch zu einer Zerteilung des doppelsträngigen RNA Moleküls in 19-25 Basenpaar (bp) große Fragmente, den sogenannten siRNAs (small interfering RNA) (Elbashir *et al.*, 2001). Durch einen als RISC bezeichneten Proteinkomplex kommt es wiederum unter Energieverbrauch zur Trennung des doppelsträngigen RNA-Fragmentes in Einzelstränge, die unabhängig voneinander inhibitorisch aktiv sind (Hammond *et al.*, 2001). In einem nachfolgenden Schritt katalysiert RISC das Zusammenführen von siRNA-Molekülen und deren potentiell in der Zelle vorhandenen komplementären messenger-RNA-Strängen. Findet eine RISC-vermittelte Bindung zwischen siRNA und komplementärer mRNA statt, hat dieses die Aufspaltung der mRNA in kleine Fragmente zur Folge, was zum Abbau letzterer führt und damit eingehend die Translation zum entsprechenden Protein verhindert. Ein gelegentlich auftretendes Problem beim Einsatz der siRNA-Technologie als molekularbiologisches Werkzeug ist die Induktion einer unspezifischen Interferon-Antwort in der transfizierten Zelle, die augenblicklich jegliche Proteinproduktion zum Erliegen bringt und unspezifisch vorhandene mRNA degradiert (Stark *et al.*, 1998). In der Regel tritt diese Komplikation bei der Transfektion zu großer Oligonukleotid-Sequenzen auf und kann durch die Verwendung von 19-25 bp großen siRNA-Duplexen weitestgehend reduziert werden (Caplen *et al.*, 2001). Dennoch ist es nötig bei jeder eingesetzten siRNA die Spezifität zu überprüfen.

In der vorliegenden Arbeit stellte die siRNA-Technologie ein wertvolles Mittel dar, in *in vitro*-Systemen effizient die Expression von mutmaßlich an der Signaltransduktion beteiligten Adapterproteinen, Kinasen und Transkriptionsfaktoren zu unterdrücken. Zur verlässlichen Transfektion der Zellen mit siRNA standen sowohl die Elektroporation, bei der die Oligonukleotide mittels „Strompuls“ die Barriere der Zellmembran überwinden, sowie der Weg der Transfektion unter Zuhilfenahme liposomaler Formulierungen zur Verfügung. Letztere Methode hat sich im zellulären Modell der Hep3B-Zelllinie als von den Zellen am besten tolerierte und zugleich effektivste herausgestellt.

### **2.5.3.1 Liposomale Transfektion von siRNA-Oligonukleotiden**

Hep3B-Zellen wurden in Kollagen-I-beschichteten 96-Kavitäten-Platten ausplattiert und in mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin supplementierten ISCOVES-Medium für 24 Stunden kultiviert. Die siRNA-Oligonukleotid-Stammlösungen wurden in Optimem<sup>®</sup> Transfektionsmedium zu entsprechenden Konzentrationen verdünnt. Die Transfektion

erfolgte unter Verwendung von Dharmafect 4<sup>®</sup> Transfektionsreagenz in antibiotikafreiem Kulturmedium und wurde entsprechend den Empfehlungen des Herstellers für die Transfektion von Hepatomazelllinien durchgeführt. Pro Kavität kamen 0,4 µL Dharmafect 4 zum Einsatz.

Produkt	Synonym	Hersteller	Bestell-Nr.
OptiMEM <sup>®</sup> + GlutaMAX	Transfektionsmedium	Gibco, Invitrogen Corporation	51985-026
DharmaFECT <sup>®</sup> Transfection Reagent	siRNA-Transfektions-Reagenz	Dharmacon / Perbio	T-2004-02
JAK1 siGENOME smart pool <sup>®</sup> Reagent	JAK1-siRNA Gemisch	Dharmacon / Perbio	M-003145-01
JAK2 siGENOME smart pool <sup>®</sup> Reagent	JAK2-siRNA Gemisch	Dharmacon / Perbio	M-003145-02
JAK3 siGENOME smart pool <sup>®</sup> Reagent	JAK3-siRNA Gemisch	Dharmacon / Perbio	M-003147-01
C/EBPα siGENOME smart pool <sup>®</sup> Reagent	C/EBPα-siRNA Gemisch	Dharmacon / Perbio	M-006422-01
C/EBPα siGENOME smart pool <sup>®</sup> Reagent upgrade	C/EBPα-siRNA	Dharmacon / Perbio	MU-006422-01
C/EBPβ siGENOME smart pool <sup>®</sup> Reagent	C/EBPβ-siRNA Gemisch	Dharmacon / Perbio	M-006423-00
C/EBPβ siGENOME smart pool <sup>®</sup> Reagent upgrade	C/EBPβ-siRNA	Dharmacon / Perbio	MU-006423-00
C/EBPδ siGENOME smart pool <sup>®</sup> Reagent	C/EBPδ-siRNA Gemisch	Dharmacon / Perbio	M-010453-00
NFκB p50 siGENOME smart pool <sup>®</sup> Reagent	p50-siRNA Gemisch	Dharmacon / Perbio	M-003520-01
NFκB p65 siGENOME smart pool <sup>®</sup> Reagent	p65-siRNA Gemisch	Dharmacon / Perbio	M-003533-01
STAT3 siGENOME smart pool <sup>®</sup> Reagent upgrade	STAT3-siRNA Gemisch	Dharmacon / Perbio	MU-003544-00
STAT3 siGENOME smart pool <sup>®</sup> Reagent	STAT3-siRNA Gemisch	Dharmacon / Perbio	M-003544-00
NFκBIξ siGENOME smart pool <sup>®</sup> Reagent	IκB zeta-siRNA Gemisch	Dharmacon / Perbio	M-013497-00

## 2.6 Reagenzien und Zubereitungen

### 2.6.1 Plasmide

Die verwendeten Expressions-Vektoren wurde als Lyophilisate bezogen, in nukleasefreien Wasser rekonstituiert und nach Amplifikation in Kompetenten *E. coli* aufgereinigt und in wässriger Lösung bei –80 Grad Celsius eingefroren.

Produkt	Lieferant	Best.-Nr
C/EBP $\alpha$	Prof. Dr. Chatterjee, Cambridge, UK	-
C/EBP $\beta$ cDNA Clone	OriGene Technologies	TC116901
C/EBP $\delta$ cDNA Clone	OriGene Technologies	TC110852
NF $\kappa$ B p50	Hr.Dr. Y. Ivashchenko	-
NF $\kappa$ B p65	Hr.Dr. Y. Ivashchenko	-
STAT3	Hr.Dr. Y. Ivashchenko	-
pNF $\kappa$ B-Luc Vector	BD Biosciences	#6053-1
Top10 <sup>®</sup> kompetente <i>E. coli</i>	Invitrogene	44-0301

### 2.6.2 Antikörper

Die bei den Western Blot Analysen und bei immunohistochemischen Bestimmungen verwendeten primären Antikörper sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Produkt	Synonym	Lieferant	Best.-Nr
Anti-C/EBP $\alpha$		Active Motif	39306
Anti-C/EBP $\beta$		Active Motif	39307
Anti-C/EBP $\delta$		Active Motif	36006
Anti-gp130	IL-6ST-Antikörper	Cell Signaling Technology	#3732
Anti-STAT3		Cell Signaling Technology	#9132
Anti-Phospho-STAT3 (Tyr705)		Cell Signaling Technology	#9131S
Anti-NF $\kappa$ B p50	Anti- NF $\kappa$ B1-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology	sc-8414
Anti-NF $\kappa$ B p65	Anti-RelA-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology	sc-109
I $\kappa$ B $\xi$	NFKBIZ-Antikörper	Abcam Ltd.	ab22065-50
Anti- $\alpha$ -Tubulin Antikörper		Calbiochem	#CP06

### 2.6.2.1 Neutralisierung der IL-6-Bioaktivität

Der monoclonale anti-human IL-6 Antikörper wurde von der Firma R & D Systems (R & D Systems Inc., Minneapolis, USA) als Lyophilisat bezogen. Nach Erhalt wurde der Antikörper in sterilem PBS rekonstituiert und in Aliquoten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zum Gebrauch gelagert. Die neutralisierende Dosis (ND), die für eine maximale Hemmung der IL-6-Bioaktivität nötig ist, wurde im zellulären Assay austitriert und betrug in Anwesenheit von  $10\text{ ng/mL}$  rekombinanten humanen Interleukin-6  $0,8\text{ }\mu\text{g/mL}$ . Entsprechende Konzentrationen des Antikörpers kamen in den beschriebenen Experimenten zum Einsatz.

Produkt	Hersteller	Bestell-Nr.
Anti-human IL-6 Antikörper	R & D Systems Inc., Minneapolis, USA	MAB2061

### 2.6.3 Zytokine

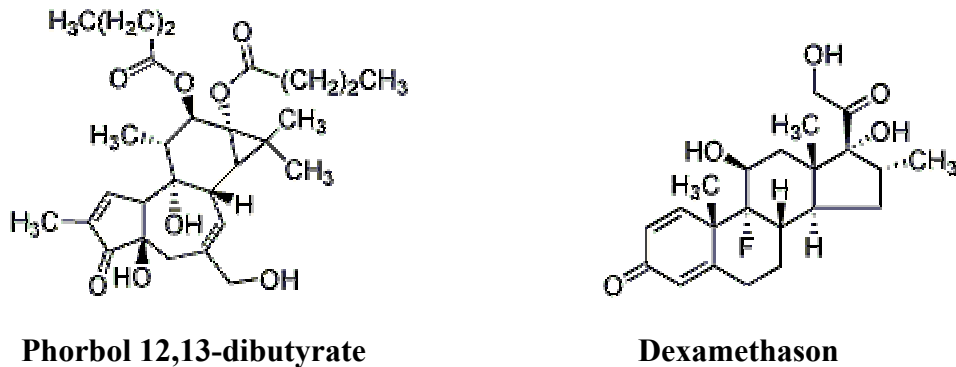
Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten humanen Zytokine wurden von der Firma R&D (Minneapolis, USA) in lyophilisierter Form erhalten, in sterilem PBS-Puffer rekonstituiert und in Aliquoten bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zum Gebrauch gelagert.

Produkt	Synonym	Hersteller	Bestell-Nr.
rekombinantes humanes TNF $\alpha$	Tumornekrose Faktor alpha	R & D Systems Inc., Minneapolis, USA	210-TA
rekombinantes humanes IL-6	Interleukin-6	R & D Systems Inc., Minneapolis, USA	206-IL
rekombinantes humanes CXCL8/IL-8	Interleukin-8	R & D Systems Inc., Minneapolis, USA	208-IL
rekombinantes humanes IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta	R & D Systems Inc., Minneapolis, USA	201-LB

## 2.6.4 Reagenzien

### 2.6.4.1 Chemische Aktivatoren der Genexpression

Die Stimulantien PDBu und Dexamethason wurden als Pulver bezogen, in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, aliquotiert und bei -80 Grad Celsius bis zum Gebrauch gelagert.



**Phorbol 12,13-dibutyrate**

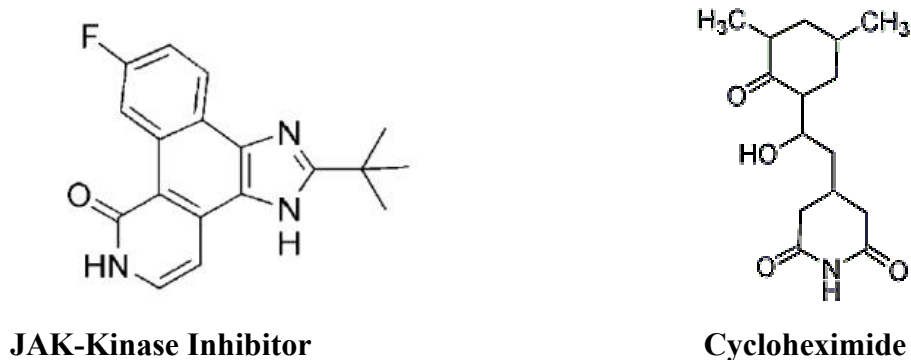
**Dexamethason**

**Abb.7 Strukturformeln von PDBu und Dexamethason**

Produkt	Synonym	Hersteller	Bestell-Nr.
PDBu	Phorbol 12,13-dibutyrat	Sigma Aldrich	P-1269
Dexamethasone	Prednisolone F	Sigma Aldrich	D-1756
DMSO	Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich	D-2650

### 2.6.4.2 Chemische Inhibitoren

Der JAK-Kinase Inhibitor, der Protein Kinase C-Inhibitor LY333531, der IKK $\alpha/\beta$ -Inhibitor und Cycloheximide wurden als Pulver bezogen, in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -80 Grad Celsius bis zum Gebrauch gelagert.



**JAK-Kinase Inhibitor**

**Cycloheximide**

**Abb.8 Strukturformeln des JAK-Kinase Inhibitors und von Cycloheximide**



Die Aktivität der verwendeten Kinase-Inhibitoren auf die Aktivität der Zielkinasen bzw. die unspezifischen Effekte der Substanzen sind in den Tabellen 3 und 4 gezeigt.

**Tab.3 Inhibition der Aktivität verschiedener Protein-Kinasen durch den verwendeten JAK-Kinase-Inhibitor** (modifiziert nach Thompson *et al.*, 2002).

Kinase	JAK1	JAK2	JAK3	Tyk2	CDK2	PKC $\alpha$	Csk	Hck	Lck	MAPK	IKK $\beta$	MEK1	Ssrc	p38
IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	0,015	0,001	0,005	0,001	3,3	1,2	2,1	7,7	>8	1,78	0,3	0,16	>8	11

**Tab.4 Inhibition der Aktivität verschiedener Protein-Kinasen durch den verwendeten IKK $\alpha$ / $\beta$ -Komplex-Inhibitor** (modifiziert nach Ritzeler *et al.*, 2000).

Kinase	IKK	PKC $\alpha$	CAMII	CDK1	CDK2	EGFR	ERK42	PKA	p38	GSK3b	MEK1	Src	IRK
% Inhibition (10 $\mu$ mol/L)	100	7	35	0	18	0	5	25	26	0	3	34	32

Produkt	Synonym	Hersteller	Bestell-Nr.
JAK-Kinase Inhibitor		Calbiochem	#420099
LY333531	Protein Kinase C-Inhibitor	Calbiochem	nicht verfügbar
Cycloheximide	Naramycin A	Sigma Aldrich	C-7698
IKK $\alpha$ / $\beta$ -Inhibitor		Aventis-Pharma GmbH	-

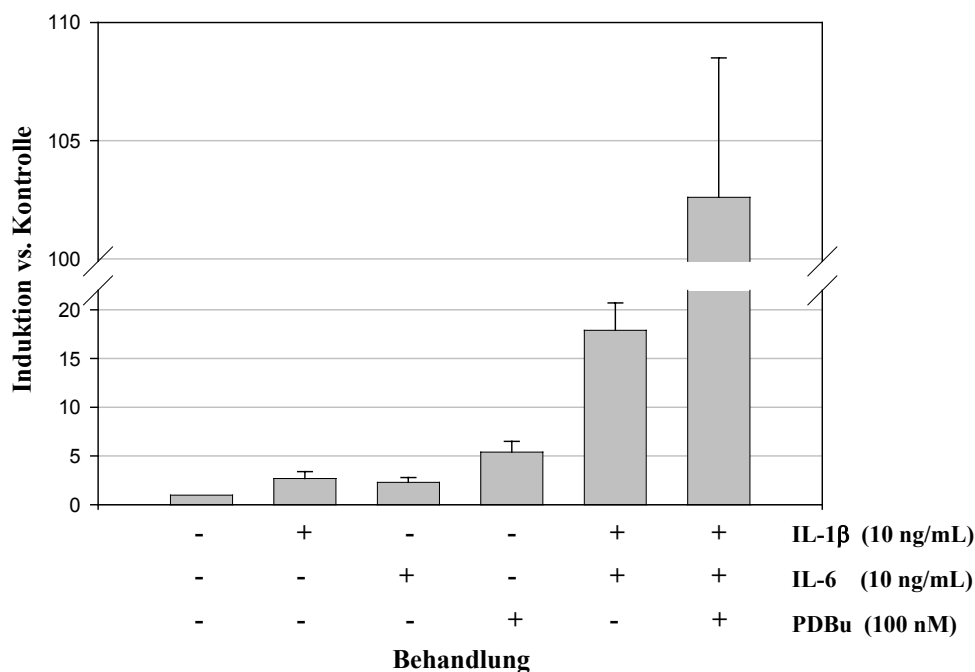
## 2.7 Statistische Analyse

Zur statistischen Bewertung der relativen Expressionsdaten wurde die Software SigmaStat Version 2.0 verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanz der differentiellen Genexpression wurde durch „Student *t* Test“ beurteilt. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet und ist in den Graphiken als „\*“ angezeigt. Mit „\*\*“ gekennzeichnete Datensätze wurden als hochsignifikant unterschiedlich bewertet, da sie einen p-Wert  $\leq 0,001$  aufwiesen. Alle weiteren verwendeten statistischen Verfahren sind in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

### 3 Ergebnisse

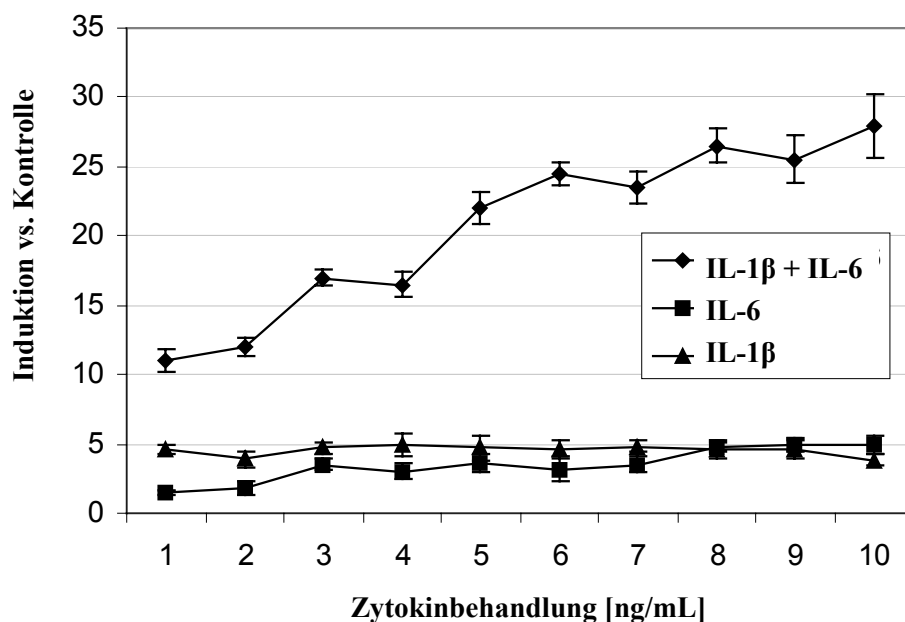
#### 3.1 CRP-Luciferase-Reportergen-Assay

Die Expression des C-reaktiven Proteins wird im Organismus durch verschiedene proinflammatorische Stimuli ausgelöst. Zur Testung der Reaktivität des generierten 1kb-CRP-Luciferase-Reportergen-Assays wurden die stabil transfizierten HepG2-Zellen mit unterschiedlichen Zytokinen und Stimulantien für 24 Stunden behandelt. Die in Tetraplikaten gemessene „relative“ Luciferaseeinheiten der Proben wurden gegen die Luciferaseaktivität der unbehandelten Kontrolle normalisiert und die Meßwerte in fach-Stimulation versus unbehandelte Kontrollzellen ausgedrückt (**Abb.9**). Die Inkubation der Zellen mit rekombinantem humanen IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) und IL-6 (10 ng/mL) hatte eine schwache Induktion der Luciferaseaktivität zur Folge (IL-1 $\beta$  = 2,7-fach; IL-6 = 2,3-fach). Eine moderate Erhöhung der CRP-Transkription konnte nach Behandlung mit Phorbol-12,13-dibutytrat (PDBu) (100 nM) beobachtet werden (5,7-fach). Für eine starke Luciferaseaktivität sorgten die Inkubation mit einer Kombination aus je (10 ng/mL) IL-1 $\beta$  und IL-6 (17,9-fach) bzw. eine Kombination aus IL-1 $\beta$ , IL-6 (je 10 ng/mL) und dem Phorbol-ester (100 nM) (102,5-fach). Ohne Wirkung blieben die Behandlung mit TNF $\alpha$  [100 ng/mL], Angiotensin II (5  $\mu$ M), Dexamethason (20  $\mu$ M), und Phenylephrin (10  $\mu$ M) (Daten nicht gezeigt).



**Abb.9 CRP-Luciferase-Reportergen-Assay:** Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$ , sowie der Phorbol-ester PDBu aktivieren einzeln oder in Kombination den CRP-Promoter.

Die optimale Zytokinkonzentration zur Stimulation des CRP-Luciferase-Reportergen-Assays wurde für IL-1 $\beta$ , IL-6 und eine Kombination beider Zytokine titriert (**Abb.10**). Steigende Konzentrationen des Zytokingemisches lösten im Bereich von 1 ng bis 8 ng je Zytokin eine kontinuierlich ansteigende Luciferaseaktivität aus. Im Bereich zwischen 8 ng und 10 ng wurde die maximale Stimulierbarkeit erreicht. Die einfache Zytokinbehandlung mit IL-1 $\beta$  oder IL-6 löste konzentrationsunabhängig nur eine minimale Reportergen-Aktivität aus (siehe auch **Abb.9**).



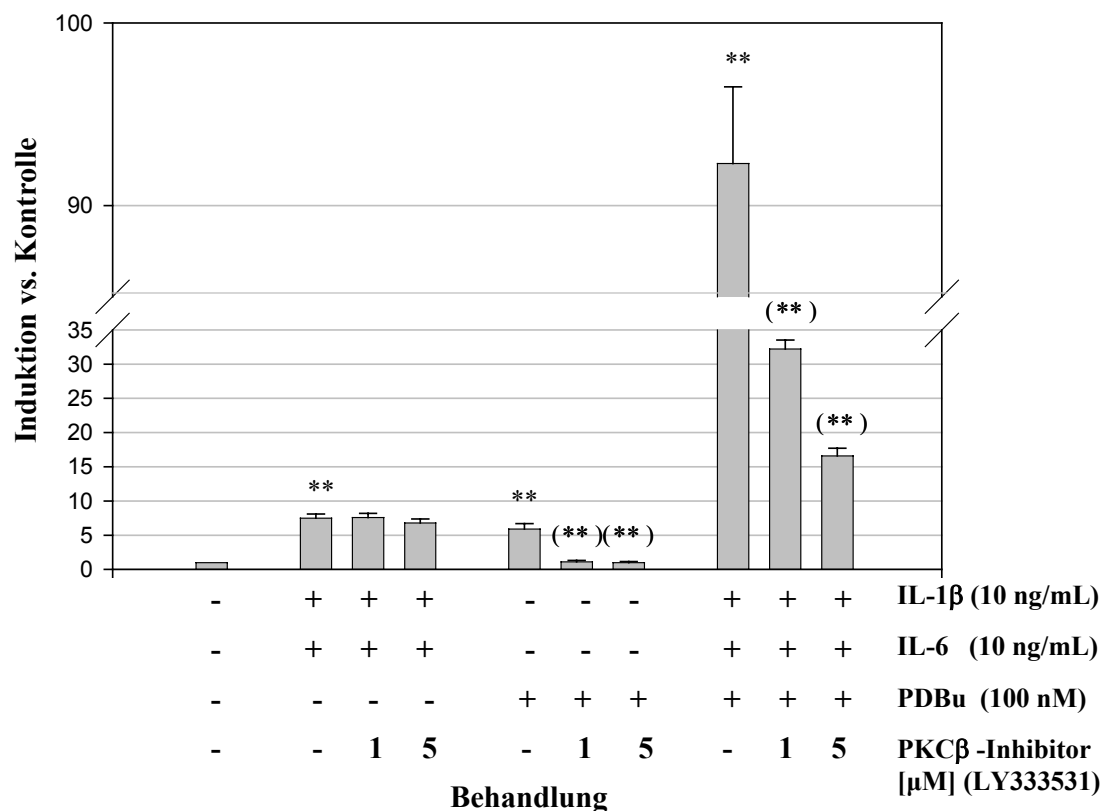
**Abb.10 CRP-Luciferase-Reportergen-Assay:**

Aktivierung des CRP-Promoters mit Zytokinen unterschiedlicher Konzentrationen.

### 3.1.1 Effekte einer Proteinkinase C-Inhibition auf die CRP-Promoteraktivität

Stabil mit dem CRP-Luciferasekonstrukt transfizierte HepG2-Zellen wurden mit dem spezifischen Proteinkinase C-Inhibitor LY333531 in unterschiedlichen Konzentrationen für 30 Minuten präinkubiert und anschließend mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  (10 ng/mL), IL-6 (10 ng/mL) oder dem Phorbolster PDBu (100 nM) für 12 Stunden stimuliert. Die Lumineszenzmessung im Anschluß an die Lyse der Zellen lieferte die in **Abb. 11** dargestellten relativen Luciferaseaktivitäten. Verglichen mit unbehandelten Zellen induzierte die Behandlung mit einer Kombination aus IL-1 $\beta$  und IL-6 eine ca. 7,5-fach erhöhte CRP-Promoteraktivität, die durch eine Präinkubation der Zellen mit Proteinkinase C-Inhibitor nicht beeinflussbar war. Die Behandlung mit dem Phorbolster PDBu erhöhte die CRP-Promoteraktivität um das 6-fache. Dieser Effekt war durch die Inkubation mit LY333531 in

den Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  komplett inhibierbar. Die durch eine Kombinationsbehandlung mit IL-1 $\beta$ , IL-6 (je 10 ng/mL) und PDBu (100 nM) induzierte 92-fache Luciferaseaktivität ließ sich durch Behandlung mit dem PKC-Inhibitor hochsignifikant reduzieren.



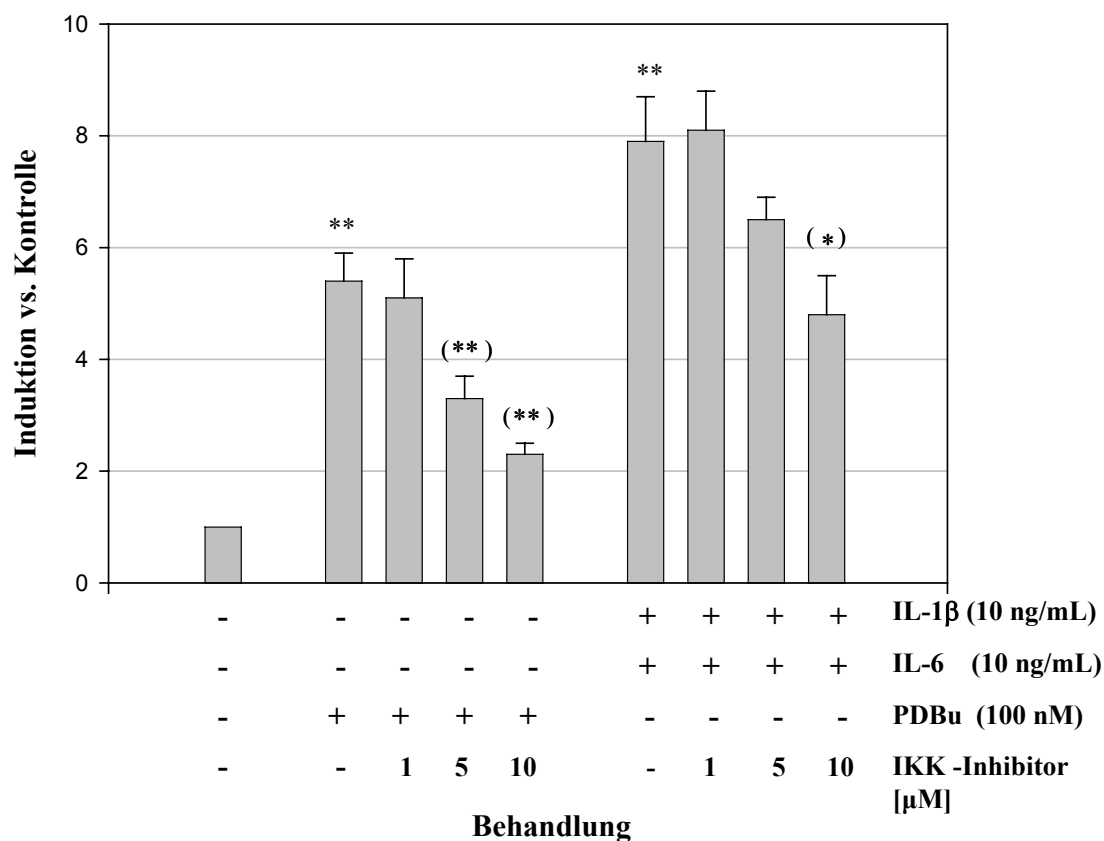
#### Abb.11 CRP-Luciferase-Reporter-Gen-Assay.

Eine Protein Kinase C  $\beta$ -Inhibition hemmt vollständig die Phorbol-ester-induzierte und partiell die durch ein Gemisch aus Zytokinen und Phorbol-ester ausgelöste CRP-Promoteraktivität.

\*\* = hochsignifikante Induktion ( $p \leq 0,001$ ); (\*\*) = hochsignifikante Hemmung ( $p \leq 0,001$ )

#### 3.1.2 Effekte einer IKK-Inhibition auf die CRP-Promoteraktivität

Stabil mit dem CRP-Luciferasekonstrukt transfizierte HepG2-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen des chemischen IKK $\alpha/\beta$ -Inhibitors vorbehandelt und anschließend mit einem Zytokingemisch aus IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) und IL-6 (10 ng/mL) bzw. dem PKC-Aktivator PDBu (100 nM) stimuliert. Der Einsatz des IKK $\alpha/\beta$ -Inhibitors in den Konzentrationen 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  inhibierte hochsignifikant die Phorbol-ester-induzierte CRP-Promoteraktivität (**Abb.12**). Eine IKK $\alpha/\beta$ -Inhibition bewirkte eine moderate aber signifikante Hemmung der Luciferaseaktivität, die durch das Zytokingemisch induziert worden war.



**Abb.12 CRP-Luciferase-Reporter Assay.**

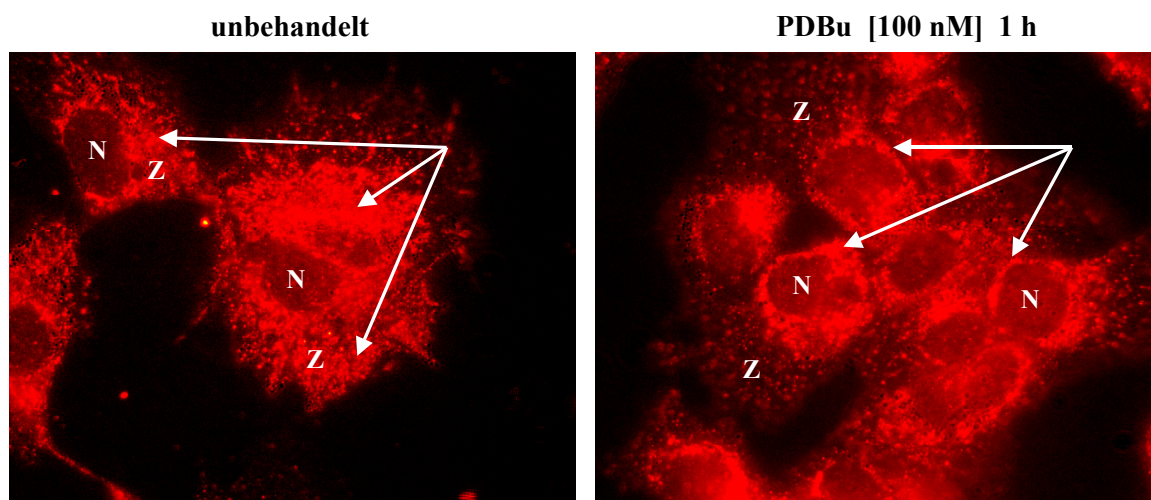
Inhibition der IκB-Kinasen alpha und beta (IKKα/β) hemmt zu ca. 50 % die Phorbol ester-induzierte CRP-Promoteraktivität und zu ca. 40 % die durch eine Kombination aus IL-1β und IL-6 ausgelöste Luciferase-Aktivität.

\*\* = hochsignifikante Induktion ( $p \leq 0,001$ ); (\*) = signifikante Hemmung ( $p \leq 0,05$ );

(\*\*) = hochsignifikante Hemmung ( $p \leq 0,001$ );

### 3.2 Immunohistochemische Detektion der Proteinkinase C beta II

Primäre humane Hepatozyten wurden in kollagen-I-beschichteten Borosilikatkulturgefäßen ausplattiert und für 1 Stunde mit PDBu (100nM) behandelt oder unbehandelt gelassen. Nach Fixierung und Permeabilisation wurde mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper die Lokalisation der Proteinkinase C beta II (PKC $\beta$ II) detektiert (**Abb.13**). Im Vergleich zu unbehandelten Zellen zeigte sich in den Phorbol ester-stimulierten Hepatozyten eine Translokation der PKC $\beta$ II zur Kernmembran, was als Zeichen ihrer Aktivierung gedeutet werden kann (Farrar *et al.*, 1985).

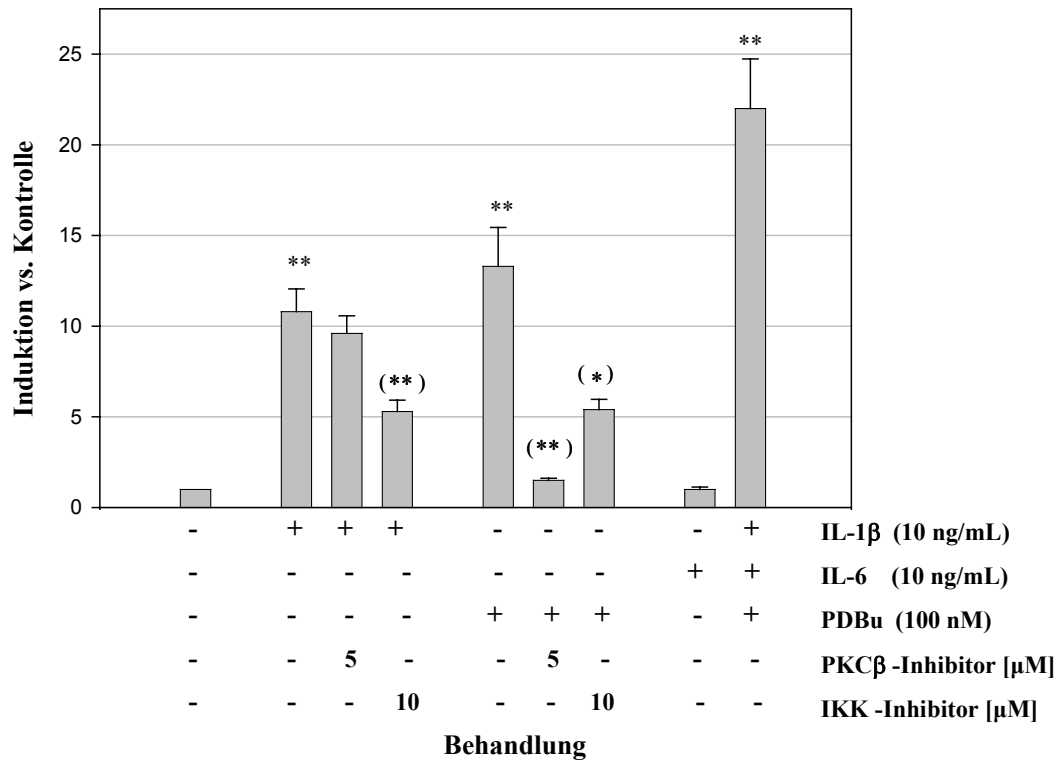


**Abb.13 Immunohistochemische Detektion der Proteinkinase C beta II (PKC $\beta$ II) in PHH.** Phorbol ester-Behandlung induzierte eine PKC $\beta$ II-Translokation zur Kernmembran. (N= Nukleus, Z=Zytosol)

### 3.3 NF $\kappa$ B-Luciferase-Reportergen-Assay

Transient mit einem NF $\kappa$ B-Luciferasereporter Konstrukt transfizierte HepG2-Zellen wurden mit dem chemischen PKC-Inhibitor LY333531, dem IKK $\alpha/\beta$ -Inhibitor und den Zytokinen IL-1 $\beta$ , IL-6 je (10 ng/mL) bzw. dem Phorbol ester PDBu (100 nM) behandelt. Interleukin-1 $\beta$  induzierte innerhalb von 12 Stunden eine 11-fach erhöhte NF $\kappa$ B-Promoteraktivität verglichen mit unbehandelten Zellen (**Abb.14**). PDBu stimulierte 13-fach, wohingegen eine Behandlung mit IL-6 keinen Effekt auf die Luciferaseaktivität ausübte. Die Stimulation der Zellen mit einer Kombination aus IL-1 $\beta$ , IL-6 und PDBu führte in bezug auf die NF $\kappa$ B-Promoteraktivität zu additiven Effekten (22-fach). Die Hemmung der Proteinkinase C mittels LY333531 blockierte vollständig die durch PDBu induzierte Luciferaseaktivität, während die

IL-1 $\beta$ -ausgelöste NF $\kappa$ B-Reporteraktivität unbeeinflusst blieb. Der IKK $\alpha/\beta$ -Inhibitor blockierte jeweils zu ca. 50 % die IL-1 $\beta$ -und PDBu-induzierte Luciferaseaktivität.



**Abb.14 NF $\kappa$ B-Luciferase-Reportergen-Assay:** Detaillierte Beschreibung siehe Text.

\*\* = hochsignifikante Induktion ( $p \leq 0,01$ ); (\*\*\*) = hochsignifikante Hemmung ( $p \leq 0,001$ ); (\*) = signifikante Hemmung ( $p \leq 0,05$ );

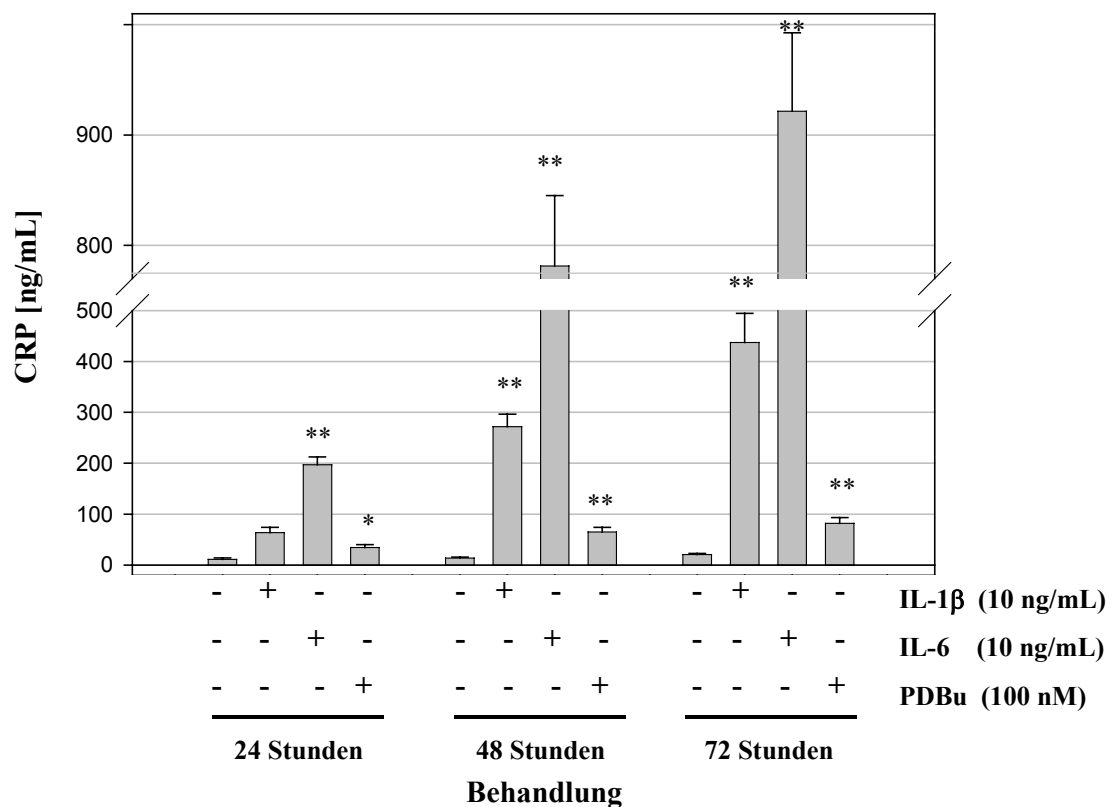
### 3.4 CRP-Expression in primären humanen Hepatozyten

#### 3.4.1 Behandlung von PHH mit Zytokinen und Phorbolster

In primären humanen Hepatozyten sollte überprüft werden, ob die Proteinkinase C-Aktivierung durch den Phorbolster PDBu zur CRP-Proteinbildung führt. Zu diesem Zweck wurden PHH in Kollagen-I-beschichtete 24-Kavitäten Kulturgefäße ausplattiert und nach einer Ruhephase von 48 Stunden mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) und IL-6 (10 ng/mL) bzw. dem PKC-Aktivator PDBu (100 nM) stimuliert. Nach 3, 24 und 48 Stunden wurden die Zellkulturüberstände entnommen und aus den Zelllysaten Gesamt-RNA isoliert. Mittels CRP-ELISA konnte die Konzentration des von den Zellen ins Kulturmedium sezernierten CRPs bestimmt werden (**Abb.15**). Quantitative RT-PCR gab Aufschluß über das Ausmaß der CRP-Transkription in Folge der Zellstimulation (**Abb.16**). Sowohl die Zytokin- als auch die



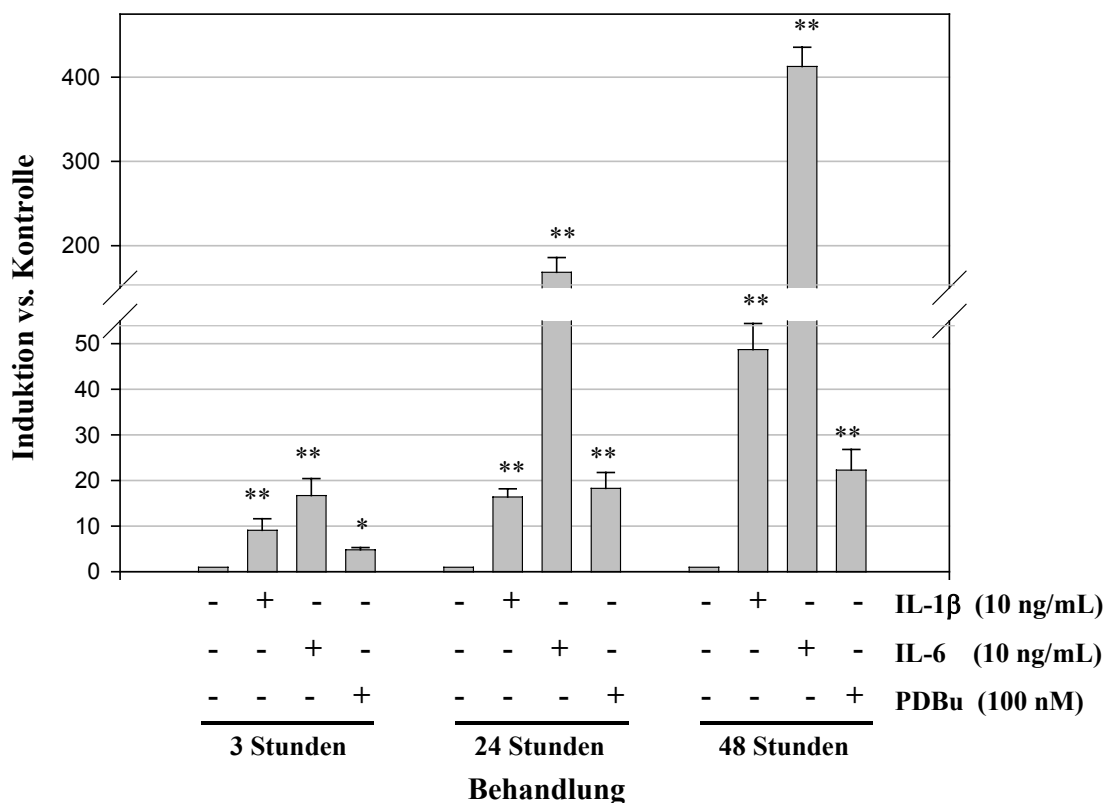
Phorbolsterbehandlung führte im Verlaufe der Zeit auf mRNA- und auf Proteinebene zu einer verstärkten CRP-Expression. Als stärkster Stimulus erwies sich die Behandlung mit IL-6, genauso wie die Inkubation der Zellen mit IL-1 $\beta$  zu einer hochsignifikant verstärkten Expression von CRP führte. Schwächster, aber dennoch signifikanter (3h) / hochsignifikanter (24+48h) Induktor war der Phorbolster. Die mittels ELISA bestimmte Konzentration des von den PHH ins Kulturmedium sezernierten CRPs entsprachen in etwa den Verhältnissen, wie sie durch die qRT-PCR ermittelt worden waren.



**Abb.15 ELISA: CRP-Expression in primären humanen Hepatozyten.**

PHH wurden mit Zytokinen bzw. Phorbolster stimuliert und sezerniertes CRP im Kulturmedium mittels ELISA quantifiziert.

\*= signifikante Induktion ( $p < 0,05$ ); \*\* = hochsignifikante Induktion ( $p < 0,001$ );



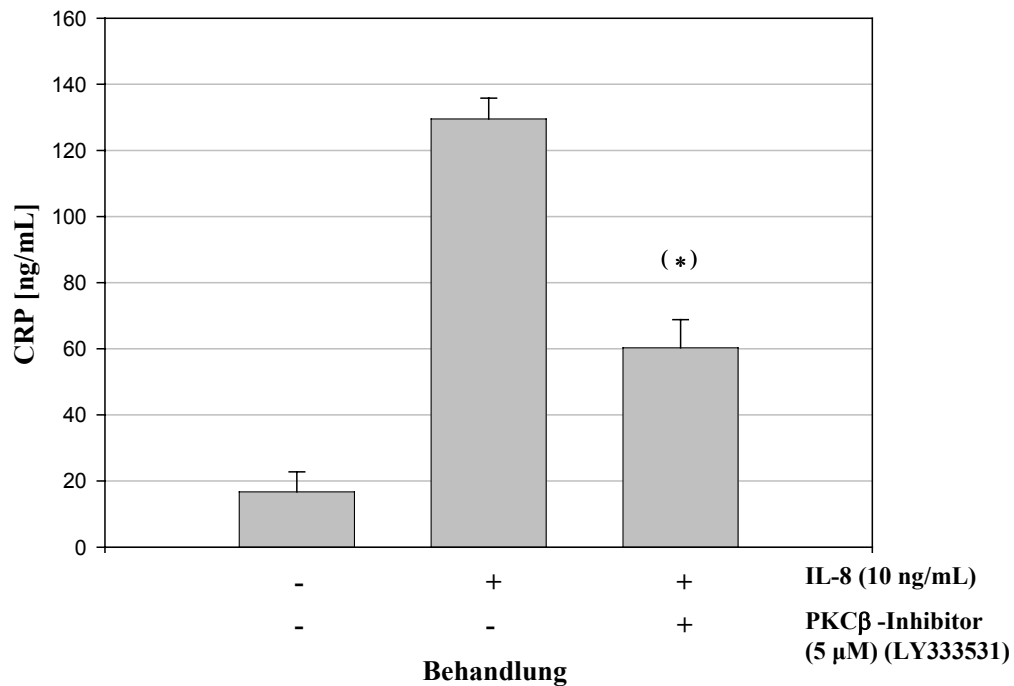
**Abb.16 qRT-PCR: CRP-Expression in primären humanen Hepatozyten.**

PHH wurden mit Zytokinen bzw. Phorbol ester stimuliert und die CRP-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen mittels quantitativer RT-PCR bestimmt.

\* = signifikante Induktion ( $p \leq 0,05$ ); \*\* = hochsignifikante Induktion ( $p \leq 0,001$ );

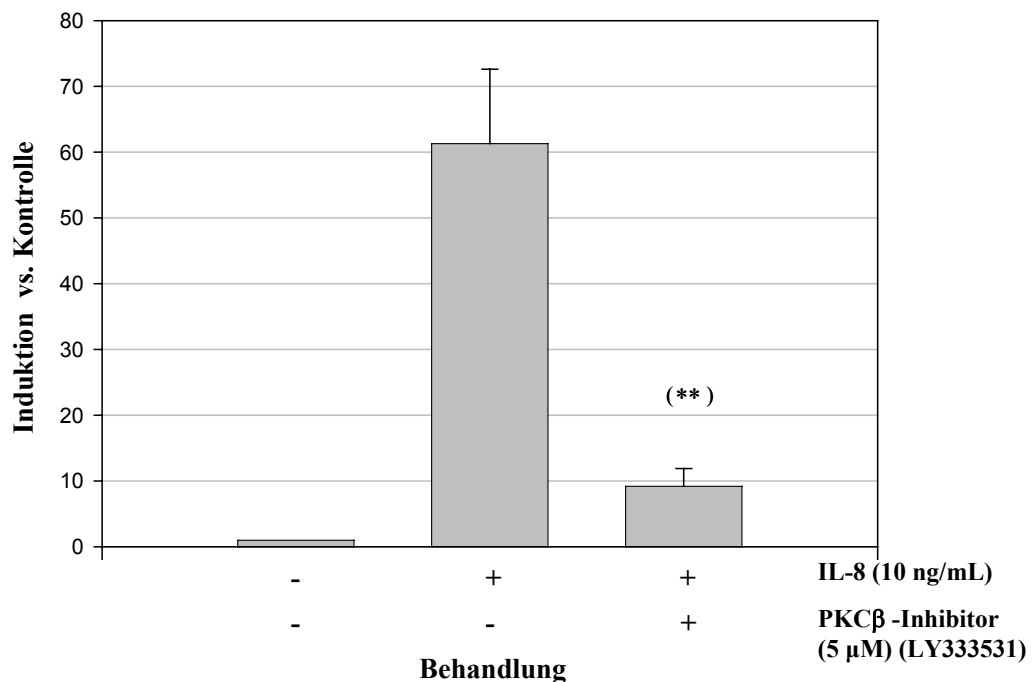
### 3.4.2 Behandlung primärer humaner Hepatozyten mit rekombinantem humanen Interleukin-8

PHH wurden in Kollagen-I-beschichtete 24-Kavitäten Kulturgefäße ausplattiert, nach einer Ruhephase von 48 Stunden mit dem PKC $\beta$ -Inhibitor LY333531 (5  $\mu$ M) vorinkubiert und mit dem Chemokin IL-8 (10 ng/mL) stimuliert. Ausschließlich mit IL-8 behandelte und unstimulierte Zellen dienten als Kontrollen. Nach 48 Stunden wurden die Zellkulturüberstände entnommen und aus den Zelllysaten Gesamt-RNA isoliert. Mittels CRP-ELISA konnte die Konzentration des von den Zellen ins Kulturmedium sezernierten CRPs bestimmt werden (Abb.17). Quantitative RT-PCR gab Aufschluß über das Ausmaß der CRP-Transkription in Folge der Zellstimulation (Abb.18). Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene induzierte die Behandlung mit IL-8 die CRP-Expression. Dieser Effekt wurde durch den PKC $\beta$ -Inhibitor LY333531 partiell aufgehoben.



**Abb.17 ELISA: CRP-Expression in primären humanen Hepatozyten.**

PHH wurden mit Interleukin-8 (IL-8) stimuliert bzw. mit IL-8 in Gegenwart eines Protein Kinase C beta-Inhibitors behandelt, und in das Kulturmedium sezerniertes CRP wurde quantifiziert. (\*) = signifikante Hemmung ( $p \leq 0,05$ );



**Abb.18 qRT-PCR: CRP-Expression in primären humanen Hepatozyten.** PHH wurden mit Interleukin-8 (IL-8) stimuliert bzw. mit IL-8 in Gegenwart eines Protein Kinase C beta-Inhibitors behandelt und anschließend die CRP-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. (\*\*) = hochsignifikante Hemmung ( $p \leq 0,001$ );

### 3.5 Primäre humane Hepatozyten und Hep3B-Zellen als Modell der Akuten Phase Reaktion

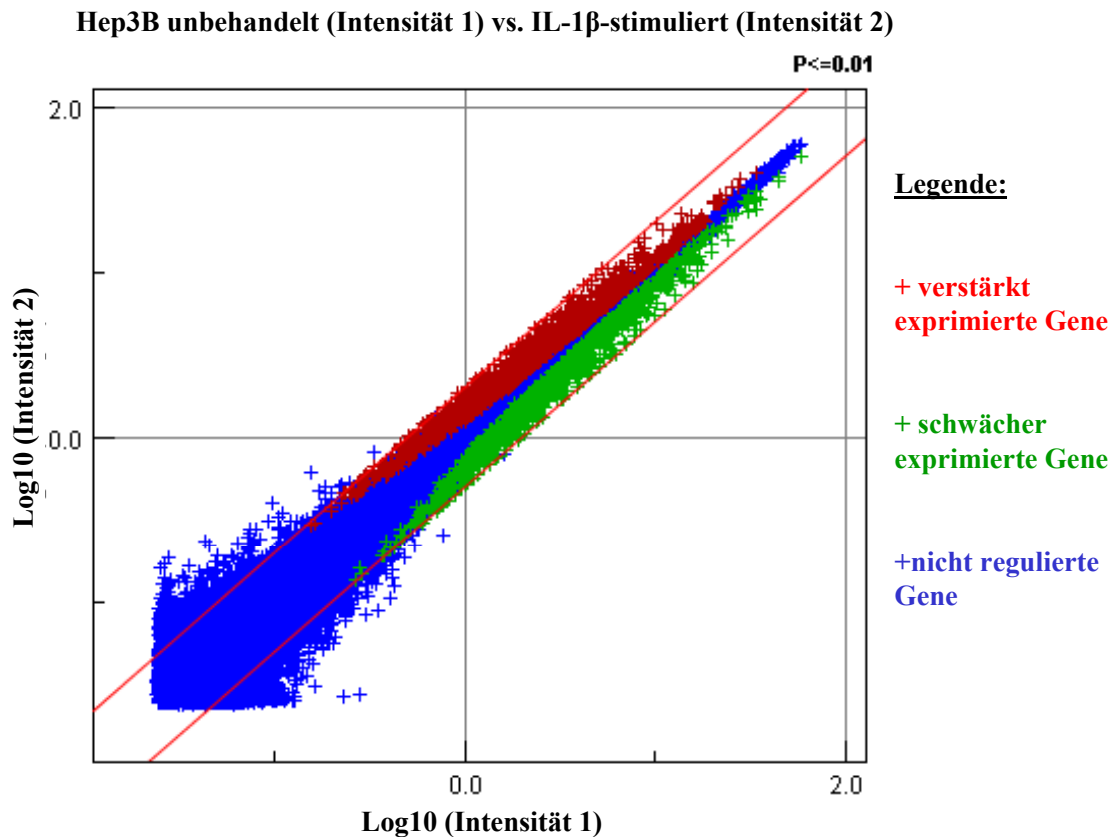
#### 3.5.1 Globale Genexpressionsanalyse in Hep3B-Zellen nach Zytokin-Behandlung

Die globale Genexpressionsanalyse durch cDNA-Microarrays bietet die Möglichkeit, in einem verhältnismäßig wenig zeitaufwendigen Verfahren die differentielle Expression vieler tausender Gene bzw. des gesamten Genoms zu überprüfen, da als Probenmaterial das gesamte Transkriptom einer Zellpopulation in Form von mRNA eingesetzt wird. Eine detaillierte Beschreibung des Funktionsprinzips dieser innovativen Technologie findet sich im „Gene Chip Expression Analysis Technical Manual“ der Firma Affymetrix (USA) bzw. unter <http://www.affymetrix.com/technology/index.affx>.

Hep3B-Zellen wurden jeweils mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  (10 ng/mL), IL-6 (10 ng/mL) und TNF $\alpha$  (100 nM) für 24 Stunden behandelt. Die aus diesen Zellen isolierte Gesamt-RNA diente als Ausgangsmaterial für die Hybridisierung von HG-U133 Plus2 Affymetrix cDNA Microarrays.

##### 3.5.1.1 Qualitätskontrolle der durch cDNA-Microarrays generierten Datensätze

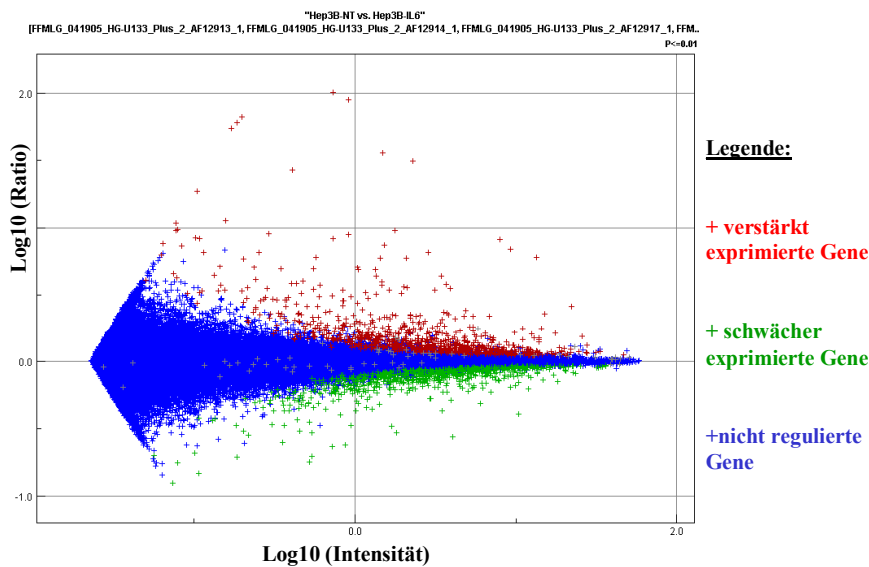
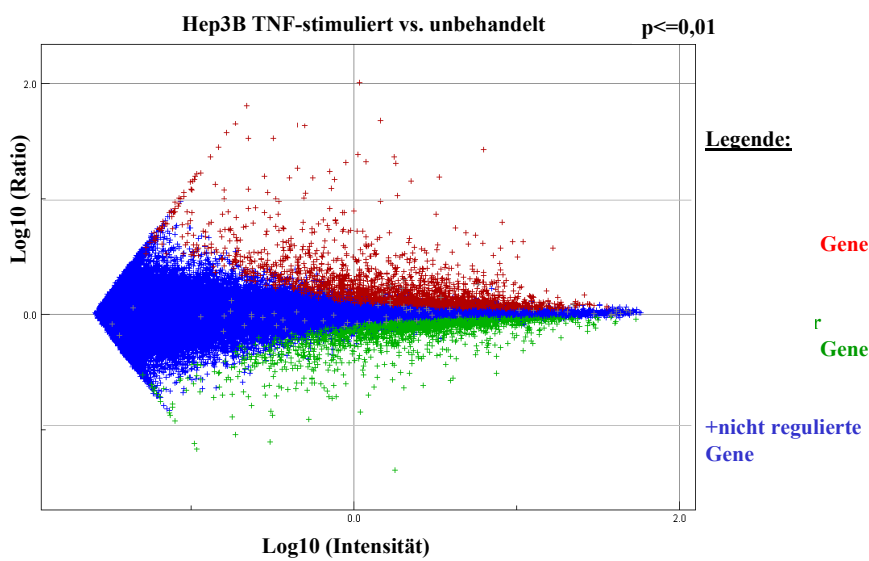
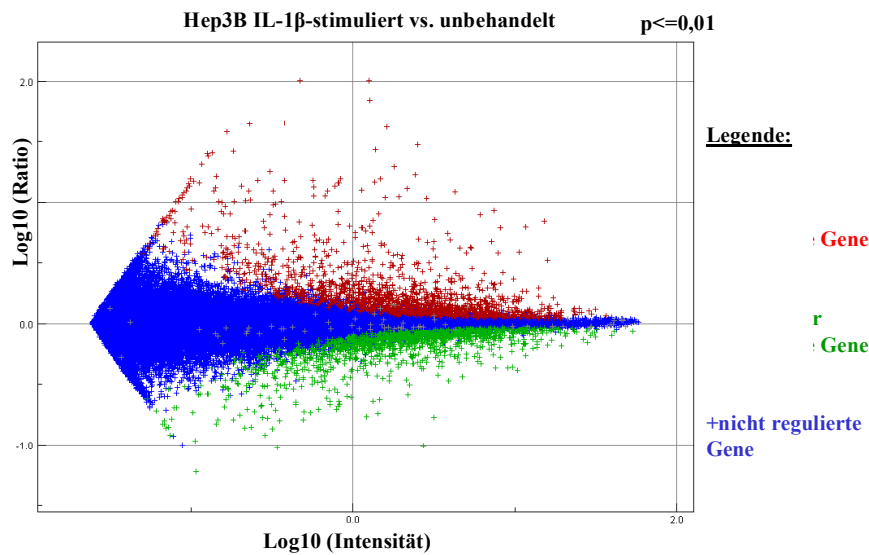
Der Auswertung der Expressiondaten ging eine Qualitätskontrolle der Datensätze voraus. Zu diesem Zweck wurde zunächst überprüft, ob die beim Lesen der Chips detektierten Fluoreszenzintensitäten aller Proben vergleichbar waren. Dies geschah, indem jeweils die Chipdaten der stimulierten Zellen gegen die Meßwerte der unbehandelten Proben aufgetragen wurden. Handelt es sich um miteinander vergleichbare Datensätze, ergibt die Darstellung der Meßwerte beider Chips in Form eines „Scatter-Plots“ im Mittel eine Gerade. Die einzelnen Meßpunkte weisen bei qualitativ hochwertigen Datensätzen ausschließlich im unteren Intensitätsbereich geringe Streuungen auf und vereinigen sich im Bereich hoher Fluoreszenzintensitäten praktisch zu einer Geraden, deren Steigung sich an 1 annähert. Alle im folgenden beschriebene Datensätze entsprachen der geforderten Qualität. Exemplarisch ist in **Abb.19** der „Scatter-Plot“ der Chips, die mit Probenmaterial unbehandelter und IL-1 $\beta$ -stimulierter Hep3B-Zellen hybridisiert wurden, dargestellt.



**Abb.19** cDNA-Microarray: “Scatter-Plot” der Fluoreszenzintensitäten zweier Chips

### 3.5.1.2 Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Im folgenden wurden Datensätze analysiert, die durch die Hybridisierung von je zwei cDNA-Microarray-Chips mit dem Probenmaterial aus unbehandelten, IL-1 $\beta$ -, IL-6- oder TNF $\alpha$ -stimulierten Zellen generiert worden waren. In einem ersten Schritt sollte die Gesamtheit aller im Vergleich zu unbehandelten Proben differentiell exprimierter Gene bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden die Signalintensitäten der behandelten und unbehandelten Proben miteinander verglichen und als Ratio gegen die absolute Intensität aufgetragen (**Abb.20**). Ohne dabei zu berücksichtigen, um welche Gene es sich im einzelnen handelt, ist auf den ersten Blick auffällig, daß die Expressionsprofile der IL-1 $\beta$ -, und TNF $\alpha$ -behandelten Zellen ähnlich erscheinen (oberer und mittlerer Plot in **Abb.20**), während nach IL-6-Stimulation ein deutlich unterschiedliches Expressionsprofil zum Ausdruck kommt (unterer Plot in **Abb. 20**). In **Tabelle 5** ist die Anzahl der nach Stimulation verstärkt oder schwächer exprimierten bzw. in ihrer Expression nicht veränderter Gene wiedergegeben.



**Abb.20**  
**cDNA-Microarray:**  
**Darstellung aller differentiell**  
**exprimierter bzw. nicht**  
**regulierter Gene in Hep3B –**  
**Zellen nach Zytokinbehand-**  
**lung.**  
 Oben: nach IL-1 $\beta$ -Behand-  
 lungStimulation;  
 Mitte: nach TNF $\alpha$ -Behand-  
 lungStimulation;  
 Unten: nach IL-6-  
 BehandlungStimulation.

**Tab.5 cDNA-Microarray: Übersicht der Anzahl an Genen, die nach Zytokin-Behandlung differentiell exprimiert wurden bzw. deren Expression unverändert blieb.**

	IL-1 $\beta$ -stimuliert	TNF $\alpha$ -stimuliert	IL-6-stimuliert
<b>Unveränderte Expression</b>	<b>51 589</b>	<b>51 202</b>	<b>53 063</b>
<b>Schwächer exprimiert</b>	<b>1 389</b>	<b>1 463</b>	<b>708</b>
<b>Verstärkt exprimiert</b>	<b>1 635</b>	<b>1 948</b>	<b>842</b>

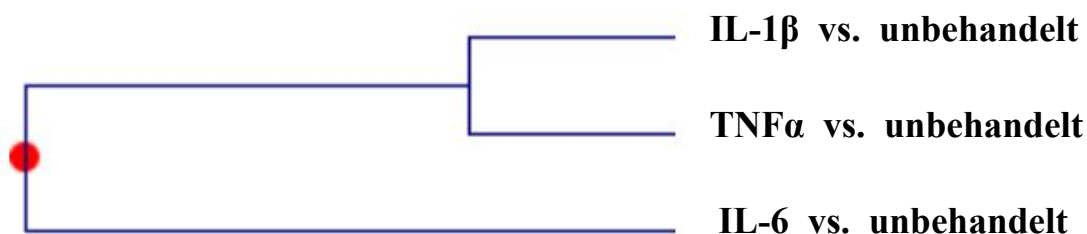
### 3.5.1.3 Zuordnung ausgewählter Gene zu definierten Genclustern

Zur Eingrenzung und Reduzierung der Datenmenge sowie der Verbesserung der statistischen Signifikanz wurden in einem weiteren Arbeitsschritt Filterkriterien auf die vorliegenden Expressionsdaten angewendet. Gene, deren Expression sich durch die Zytokinbehandlung geringer als um den Faktor 2 veränderte, bzw. Meßwerte mit einem p-Wert > 0,01 wurden bei der Analyse nicht berücksichtigt.

Werden Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Genexpressionsprofile verschieden behandelter Zellpopulationen als Kriterium zur Gruppierung der differentiell exprimierten Gene herangezogen, so spricht man vom „Clustern“ der Expressionsdaten. In **Abb.21** sind verschiedene Resultate eines sogenannten “2D-Clustering“ gezeigt. Bei dieser Art der Datenanalyse wurde die differentiell exprimierten Gene vollkommen unabhängig von ihrer physiologischen Rolle oder ihrer Zugehörigkeit zu definierten Genfamilien nach ihrem Expressionsprofil, das nach Zytokinbehandlung auftritt, gruppiert. Die Ergebnisse dieser Datenanalyse sind die in **Abb.22** gezeigten Dendrogramme, in denen Gene in Abhängigkeit von der Vergleichbarkeit ihres Expressionsprofils hierarchisch in Gruppen eingeteilt wurden. Je ähnlicher die Charakteristika zweier Transkripte in bezug auf ihre Expression sind, desto geringer ist ihre räumliche Distanz innerhalb des Dendrogrammes zueinander. Gene, die durch mehrerer Verzweigungen der Dendrogramm-Äste voneinander getrennt sind, sind bezogen auf ihre Expressionsprofil nur entfernt miteinander verwandt. Die Methode des hierarchischen Clusters wurde von Eisen *et. al.* (1999) und Alon *et al.* (1998) ausführlich beschrieben. In welcher Form sich die mRNA-Expression eines bestimmten Genes nach Zytokinbehandlung verändert hat, ist in Form eines „Hitzefeldes“ dargestellt. Entsprechend der Legende in **Abb.22** sind verstärkt exprimierte Gene durch ein rot gefärbtes Feld beschrieben. Nach Zytokin-Behandlung schwächer transkribierte Gene sind durch grüne Felder repräsentiert und schwarze Flächen weisen auf eine nicht signifikant veränderte

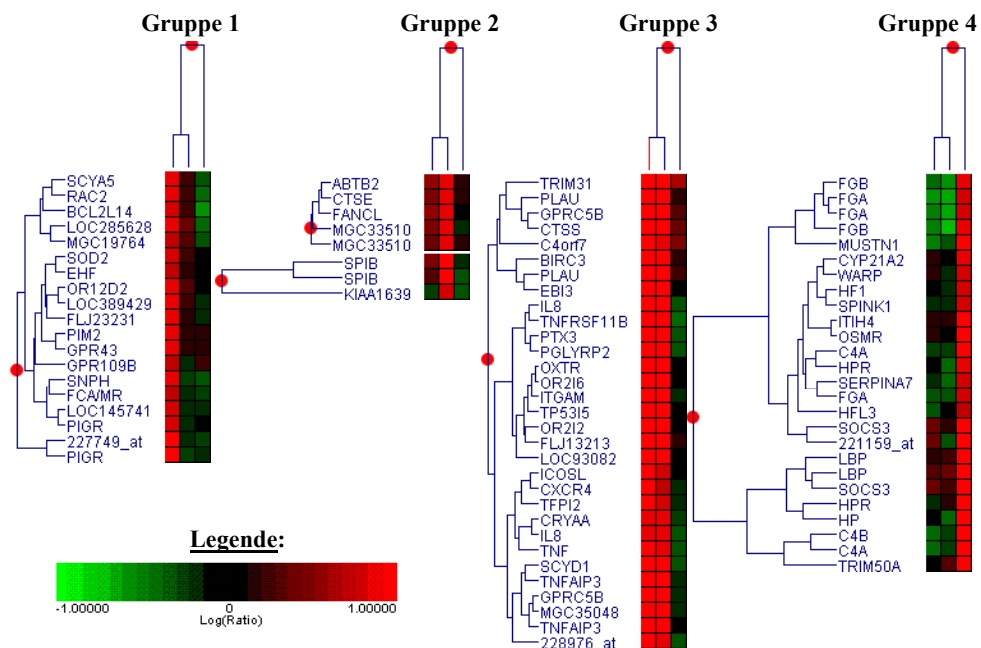
Transkription hin. Innerhalb jedes Hitzefeldes spiegelt die linke Spalte die Genexpression nach IL-1 $\beta$ -Behandlung, die mittlere Spalte die Expression nach TNF $\alpha$ -Stimulation und die rechte Spalte die Expression nach Inkubation der Zellen mit IL-6 wieder. Insgesamt wurden nach Behandlung mit IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  oder IL-6 und der Anwendung der oben beschriebenen Filterkriterien in Hep3B-Zellen 805 differentiell exprimierte Gene identifiziert. In **Abb.22** sind einige dieser Gene wiedergegeben und in Gruppen eingeteilt worden: Gruppe 1 zeigt Gene deren Transkription ausschließlich bzw. hauptsächlich durch IL-1 $\beta$ -Behandlung induzierbar war. Gruppe 2 repräsentiert hauptsächlich TNF $\alpha$ -abhängige Transkripte. In Gruppe 3 befinden sich Gene, deren Expression sowohl durch IL-1 $\beta$  als auch durch TNF $\alpha$  angeregt wurde, und Gruppe 4 beinhaltet praktisch ausschließlich IL-6-induzierte Transkripte.

Wie auch schon in **Abb.20** zu erkennen, wurde bei der elektronischen Analyse der Expressionsprofile, in Abhängigkeit von der Zytokinbehandlung, eine Ähnlichkeit zwischen den IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -induzierten Genpopulationen erkannt, die sich eindeutig von der Population der IL-6-induzierten Transkripte unterscheidet. Stellt man dieses Verhältnis als Dendrogramm dar, so ergibt sich die in **Abb.21** dargestellte Graphik.



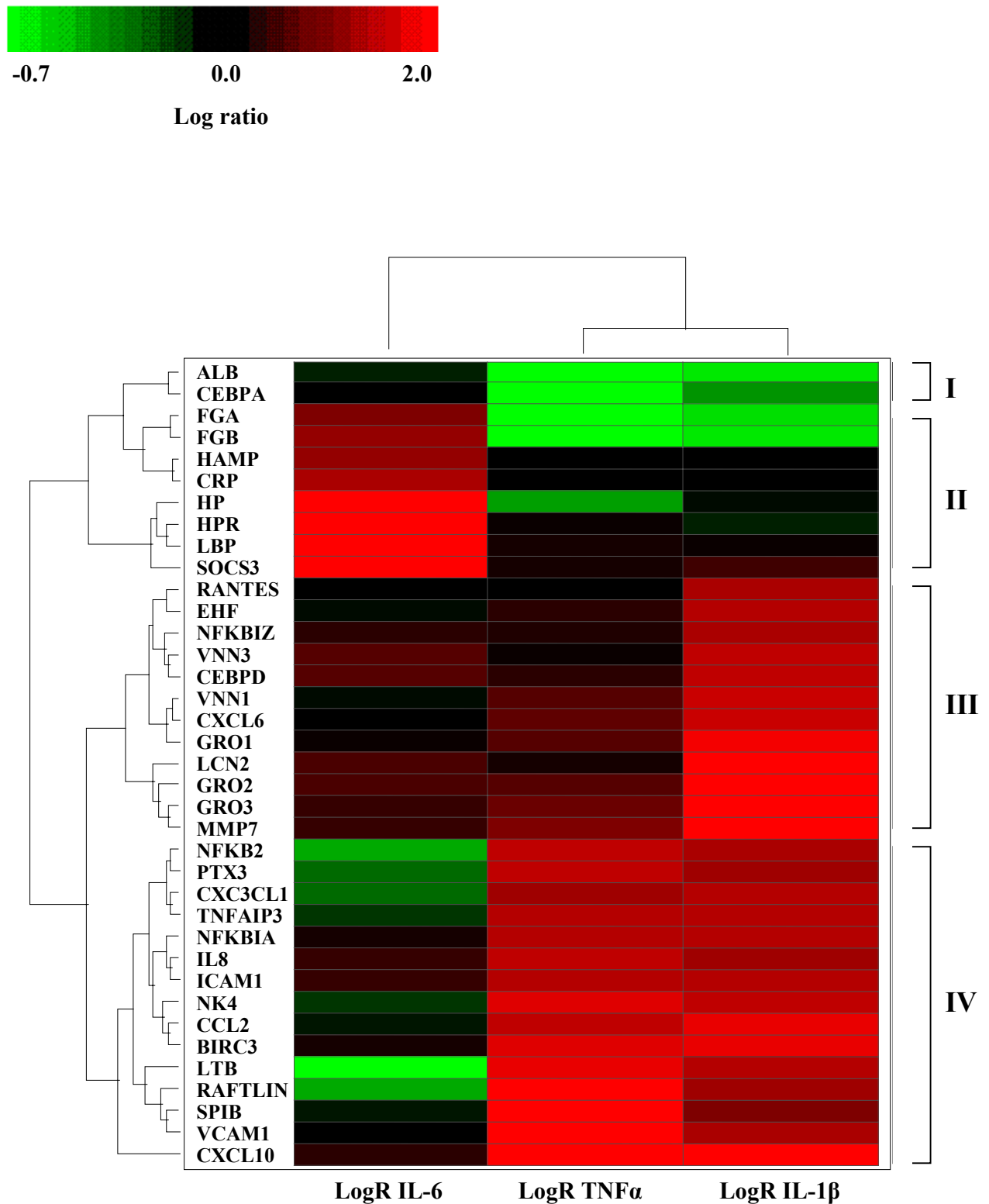
**Abb.21** cDNA Microarray: „2D-Clustering“ der in Hep3B-Zellen nach Zytokin-Behandlung differentiell exprimierten Gene.





**Abb.22 cDNA-Microarray: Einteilung verschiedener Gene entsprechend ihrer Expression in Hep3B-Zellen nach Zytokinbehandlung durch hierarchisches „2D“-Clustern.** Die Werte der relativen Expression verschiedener APP sind in Form eines Hitzefeldes dargestellt. Rote Färbung entspricht einer verstärkten Expression, grüne Flächen spiegeln verringerte Genexpression wider und eine schwarze Färbung bedeutet, daß keine differentielle Genexpression vorliegt. Die Farbintensität gibt Aufschluß über das Maß der veränderten Expression (siehe Legende). (detaillierte Beschreibung siehe Text).

In einem weiteren Schritt wurde aus der Gesamtheit der 805 nach Zytokin-Behandlung differentiell exprimierter Gene manuell 37 Akute Phase Proteine ausgewählt und deren Expressiondaten in Form eines Hitzefeldes mit logarithmischer Skalierung dargestellt (**Abb.23**). Jede Spalte der Graphik gibt die Genexpression als Logarithmus der Ratio nach der Behandlung mit IL-6 (linke Spalte), TNF $\alpha$  (mittlere Spalte) oder IL-1 $\beta$  (rechte Spalte) wieder. Die beschriebenen APP wurden in vier Gengruppen, sogenannte Cluster, unterteilt. Wobei Cluster I negative APP und APRIP beinhaltet, Cluster II IL-6-induzierbare Transkripte widerspiegelt, Cluster III Gene beschreibt, die in Hep3B-Zellen hauptsächlich durch IL-1 $\beta$  stimuliert wurden und Cluster IV beinhaltet die Gene, deren Transkription sowohl durch IL-1 $\beta$  als auch durch TNF $\alpha$  induziert wurde.

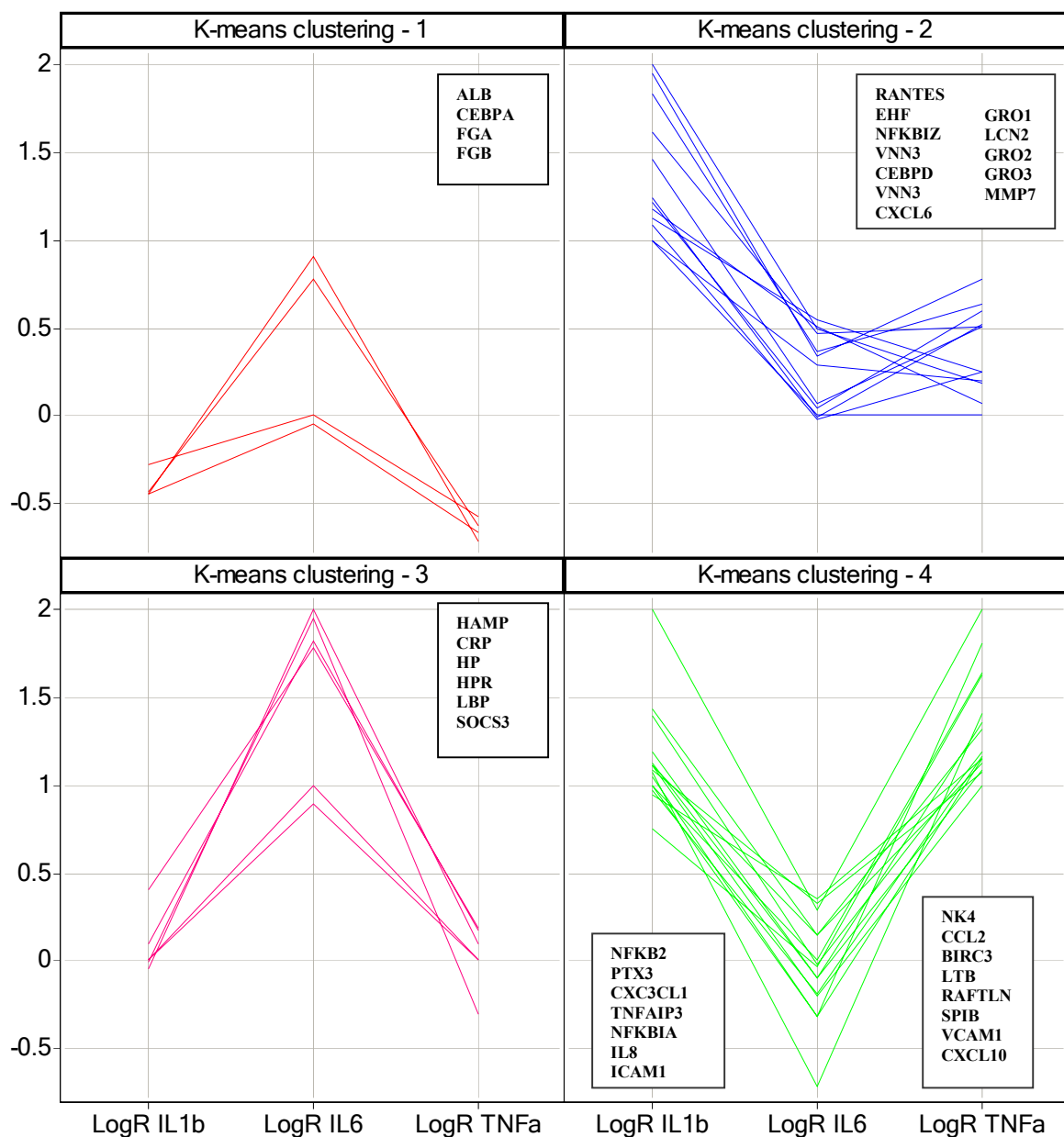


**Abb.23 cDNA-Microarray: 2D hierarchisches Clustern - Einteilung verschiedener Akute Phase Proteine in vier Gencluster.** Beschreibung siehe Text.

Die Expressionsdaten der APP aus **Abb.23** wurden außerdem durch die Methode des „K-means-Clustering“ in vier Gruppen eingeteilt. Die Ergebnisse dieser Form der Datenanalyse

wurden in **Abb.24** visualisiert. Die Bewertung von Datensätzen durch „K-means-Clustering“ bietet sich dann an, wenn die Einteilung der betrachteten Meßwerte in eine definierte Anzahl von Gruppen gewünscht wird, da bei diesem Analyseverfahren die Zahl der Cluster vorgegeben werden kann. Die Prinzipien, die sich im Detail hinter der Methode des „K-means-Clustering“ verbergen, wurden von Sherlock *et. al.*, (2000) beschrieben. Diese Art der Datenanalyse lieferte als Ergebnis eine geringfügig unterschiedliche Einordnung der einzelnen Transkripte in die vier Gencluster als das vorausgegangene hierarchische „2D-Clustering“ (FGA und FGB wurden Cluster II zugeordnet) bestätigte aber ansonsten die vorherige Beurteilung.

### K-means clustering

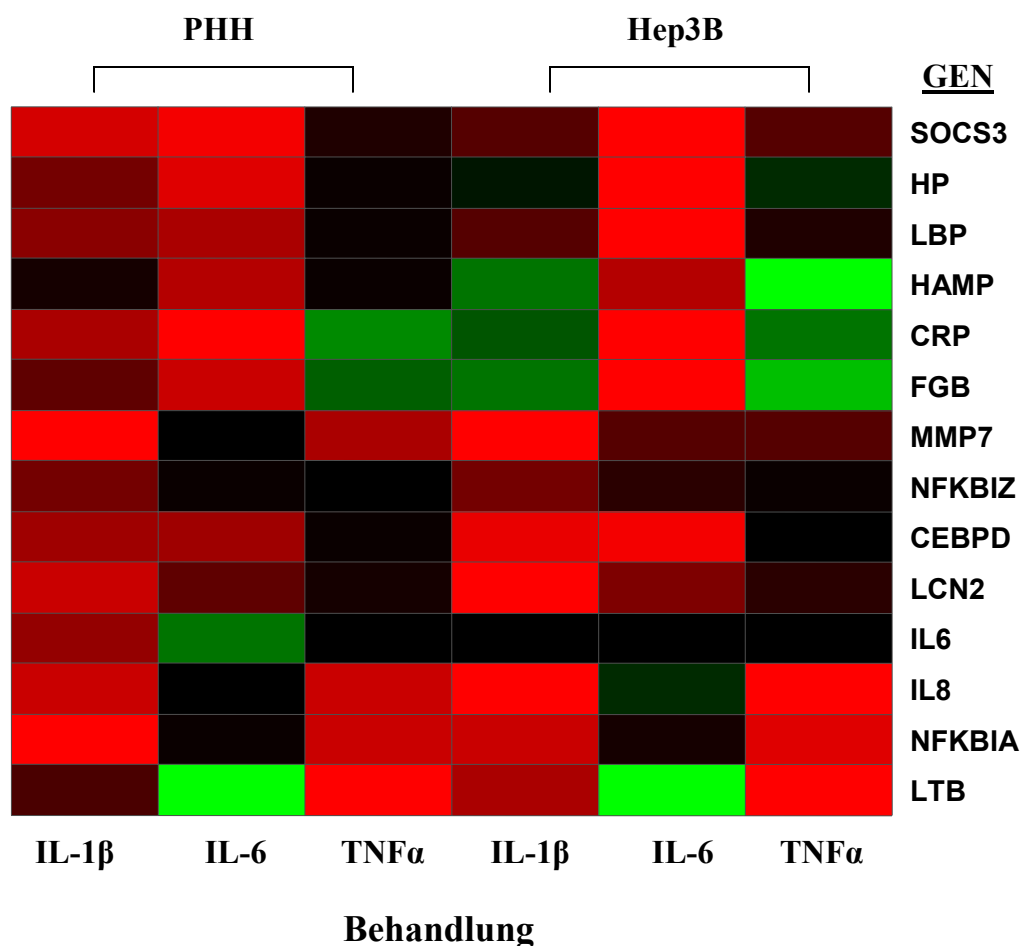


**Abb.24 cDNA-Microarray: K-means Clustern - Einteilung verschiedener Akute Phase Proteine in Gencluster.** Die Expression ausgesuchter Gene ist als Logarithmus der Ratio (LogR) angegeben.

### 3.5.2 Mechanismen der CRP-Expression in PHH

#### 3.5.2.1 Vergleich der Expression einzelner Akute Phase Proteine in primären humanen Hepatozyten und Hep3B-Zellen

Die Expression einzelner Vertreter der zuvor in **Abb.23/24** beschriebenen Gencluster in PHH und Hep3B-Zellen wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt und ist in **Abb.25** als Hitzefeld dargestellt. Es fällt auf, daß die Gene „Suppressor of Cytokine Signaling 3“ (SOCS3), Haptoglobin (HP), Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP), Fibrinogen alpha /beta (FGA/FGB) und C-reaktives Protein (CRP) in Hep3B ausschließlich IL-6-induzierbar sind, während die Expression dieser Gene in PHH sowohl durch IL-1 $\beta$  als auch durch IL-6 angeregt wird. Zur Aufklärung dieses Umstandes wurde im folgenden die Expression verschiedener auffälliger Gene in PHH und Hep3B genauer mittels quantitativer RT-PCR untersucht.

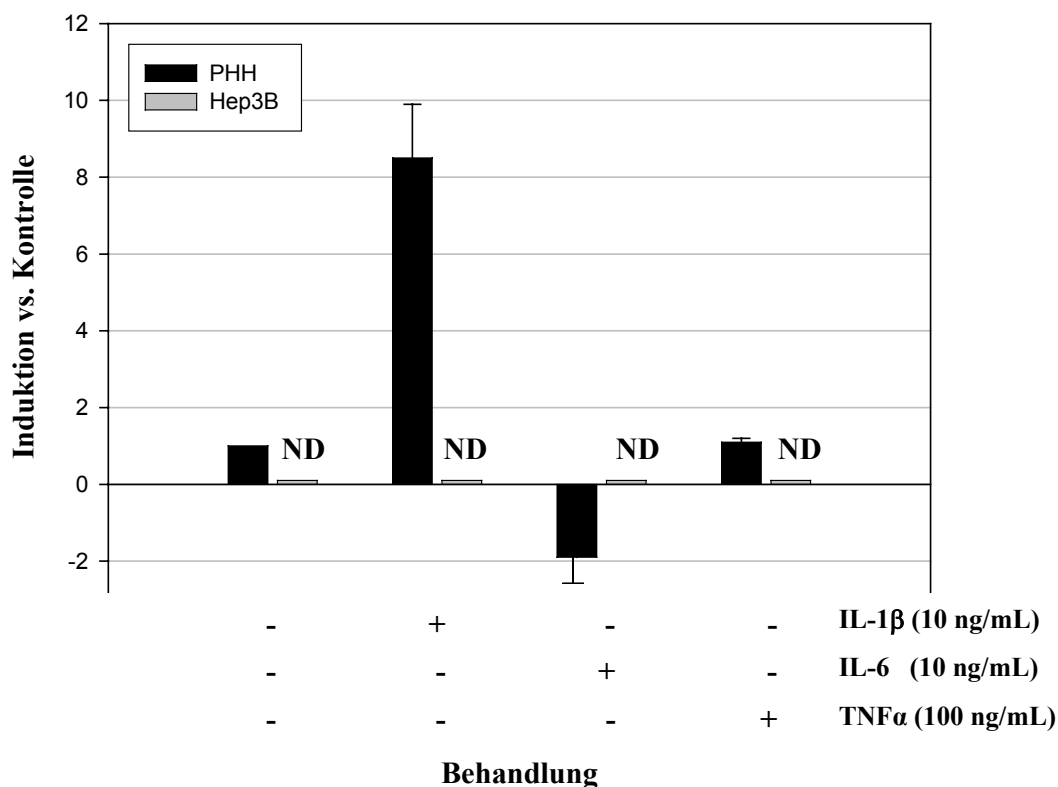


**Abb.25 qRT-PCR: Expression verschiedener Akute Phase Proteine in PHH und Hep3B-Zellen nach Zytokinbehandlung.** Die Werte der relativen Expression verschiedener APP wurden in Form eines Hitzefeldes dargestellt. Rote Färbung entspricht einer verstärkten Expression, grüne Flächen spiegeln verringerte Genexpression wider und eine schwarze Färbung bedeutet, daß keine differentielle Genexpression vorliegt. Die Farbintensität gibt Aufschluß über das Maß der veränderten Expression.

### 3.5.2.2 IL-6-Expression in primären humanen Hepatozyten und Hep3B-Zellen

Da die Induktion IL-6-abhängiger Gene wie, z.B. CRP, HP und SOCS3 in PHH durch IL-1 $\beta$  Behandlung auf eine IL-1 $\beta$ -induzierte IL-6-Produktion zurückzuführen sein könnte, wurde die IL-6 Expression in PHH und Hep3B nach Zytokinbehandlung überprüft. Eine autokrine IL-1 $\beta$ -induzierte IL-6-Expression käme als Erklärung für das ähnliche Genexpressionprofil nach IL-1 $\beta$  und IL-6 Behandlung in PHH in Frage.

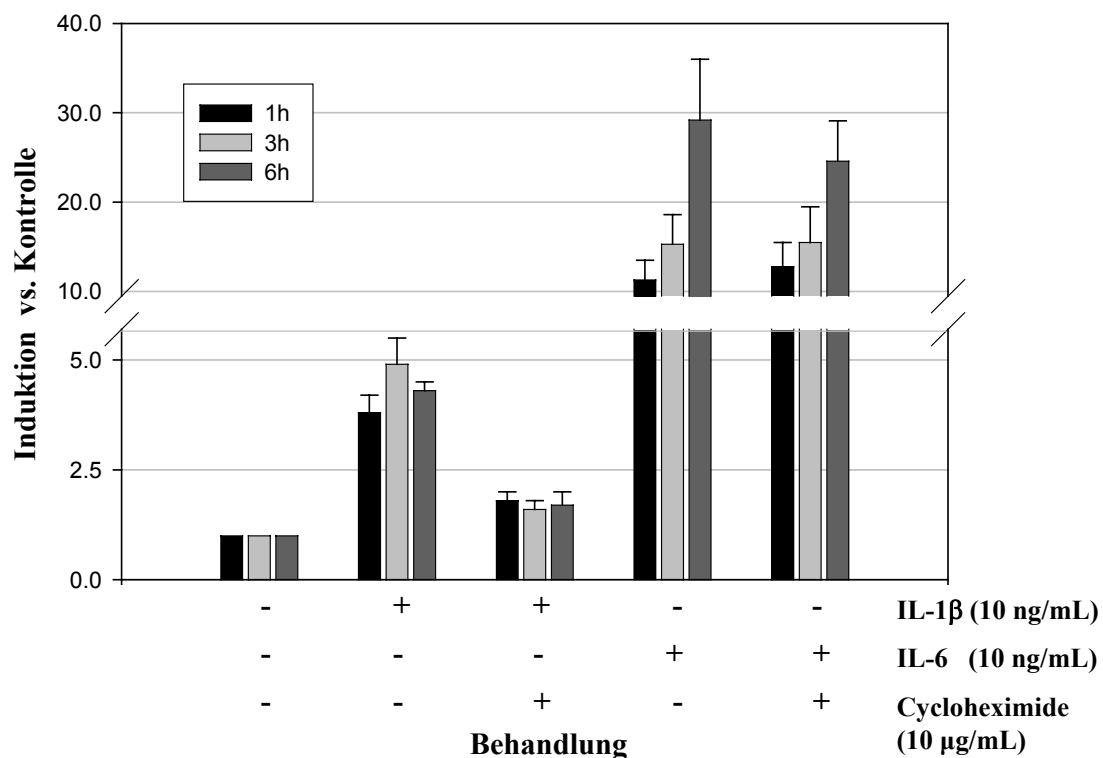
PHH und Hep3B wurden für 24 Stunden mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  (10 ng/mL), IL-6 (10 ng/mL) und TNF $\alpha$  (100 nM) behandelt. Die Interleukin-6-mRNA Expression wurde unter Zuhilfenahme der qRT-PCR bestimmt (**Abb.26**). In PHH induzierte IL-1 $\beta$ -Behandlung die IL-6-Transkription, während IL-6-Stimulation vermutlich als Folge eines negativen Rückkopplungseffektes die IL-6-Expression inhibierte. TNF $\alpha$ -Behandlung zeigte keine Effekte auf die IL-6-mRNA-Synthese. In Hep3B-Zellen führte keine der Zytokinbehandlungen zu einer detektierbaren IL-6-Expression, was ein Hinweis darauf sein könnte, daß in diesen Zellen ein Defekt innerhalb des IL-6-Genes oder in dessen Promotersequenz vorliegt.



**Abb.26 qRT-PCR: Interleukin-6-Expression in primären humanen Hepatozyten und Hep3B-Zellen.** PHH und Hep3B wurden mit verschiedenen Zytokinen behandelt und die IL-6-mRNA-Expression mittels quantitativer RT-PCR ermittelt. ND = nicht detektierbar

### 3.5.2.3 Behandlung von PHH mit dem Proteinbiosynthese-Inhibitor Cycloheximide

Sollte die Induktion von CRP und weiterer APP in PHH nach IL-1 $\beta$  Stimulation ein indirekter Effekt sein, der durch gebildetes IL-6 vermittelt wird, so müßte die Hemmung der Proteinbiosynthese die IL-1 $\beta$ -induzierte CRP-Synthese inhibieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden PHH mit IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) und IL-6 (10 ng/mL) behandelt, bzw. mit einer Kombination aus dem Proteinbiosynthese-Inhibitor Cycloheximide (10  $\mu$ g/mL) und dem entsprechenden Zytokin inkubiert. Nach 1, 3 und 6 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert und die CRP-Expression mittels qRT-PCR überprüft. Längere Inkubationszeiten mit Cycloheximide sind aufgrund der drohenden zytotoxischen Effekte nicht möglich. Cycloheximide blockierte die IL-1 $\beta$ -ausgelöste CRP-Synthese signifikant und zeigte keinerlei



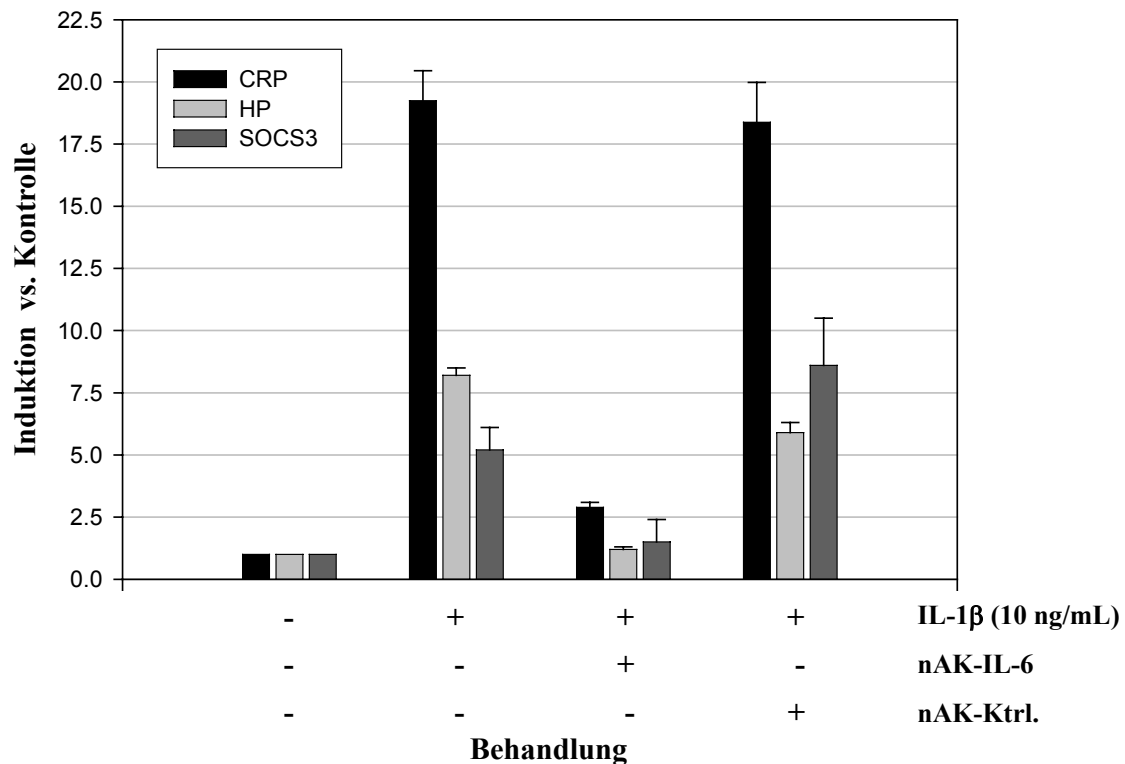
Auswirkung auf die IL-6-induzierte CRP-Transkription (Abb.27)

**Abb.27 qRT-PCR: CRP-Expression in PHH.** Nach Behandlung von PHH mit Interleukin-1 $\beta$  oder Interleukin-6 in Anwesenheit und Abwesenheit eines Proteinbiosynthese-Inhibitors wurde die CRP-Expression mittels quantitativer RT-PCR bestimmt.

### 3.5.2.4 Behandlung von PHH mit neutralisierenden Interleukin-6-Antikörpern

Um die potentielle Rolle autokrin produzierten IL-6 bei der IL-1 $\beta$ -induzierten CRP-Synthese zu hinterfragen, wurden PHH mit IL-1 $\beta$  in Gegenwart neutralisierender IL-6-Antikörper bzw. Kontroll-Antikörpern behandelt (Details siehe Materialien und Methoden) und anschließend die Expression IL-6-abhängiger Gene wie C-reaktives Protein (CRP), Haptoglobin (HP) und „Suppressor of Cytokine Signaling 3“ (SOCS3) mittels qRT-PCR überprüft.

Die durch IL-1 $\beta$  ausgelöste Expression von CRP, HP und SOCS3 wurde signifikant durch den IL-6-neutralisierenden Antikörper inhibiert, während der Kontroll-Antikörper keinen Effekt auf die Expression der genannten Gene hatte (**Abb.28**).



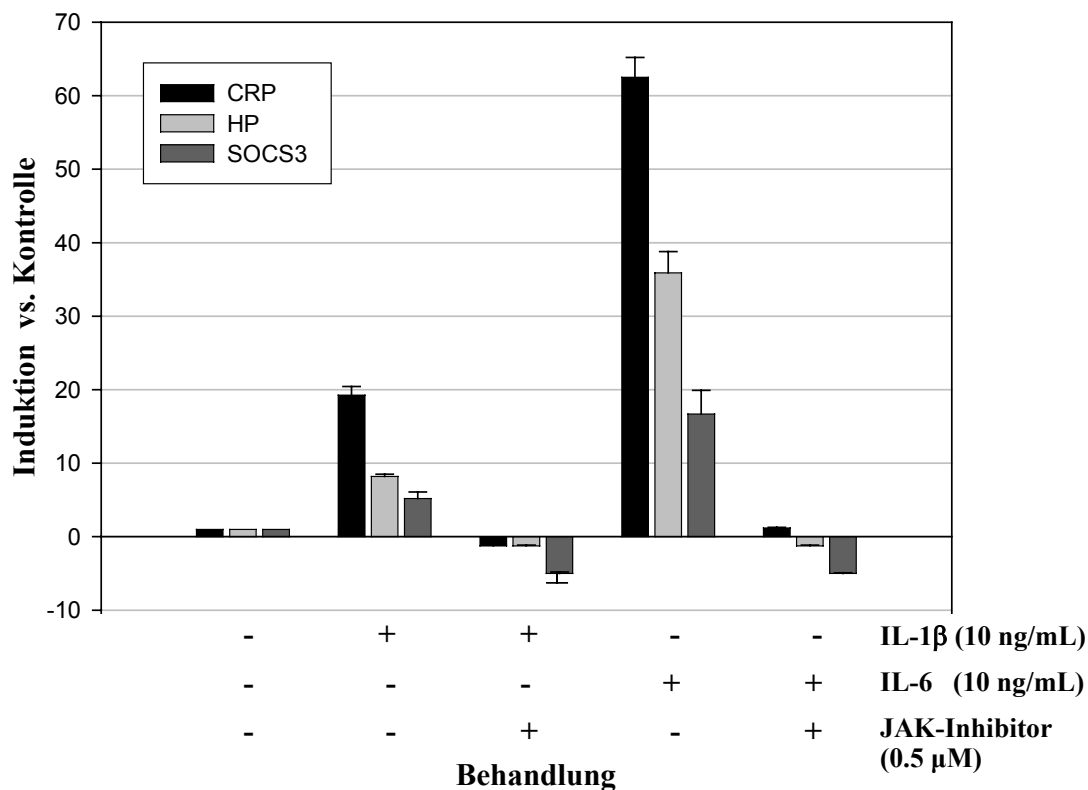
**Abb.28 qRT-PCR: Effekt IL-6-neutralisierender Antikörper auf die Interleukin-1 $\beta$ -induzierte Expression verschiedener Akute Phase Proteine in PHH.**

Neutralisierende Antikörper gegen Interleukin-6 inhibieren die IL-1 $\beta$ -induzierte CRP-, HP- und SOCS3-Expression.

### 3.5.2.5 Behandlung von PHH mit einem spezifischen JAK-Kinase-Inhibitor

Die Tyrosin-Kinase JAK2 stellt einen zentralen Bestandteil der Interleukin-6-Signaltransduktion da (siehe Einleitung). Sollte eine IL-6-Produktion in Folge der IL-1 $\beta$ -Behandlung die Ursache für die IL-1 $\beta$ -induzierte CRP-, HP- und SOCS3-Expression sein,

dann würde die Inhibition der JAK2-Kinase die Induktion dieser Gene nach IL-1 $\beta$ -Stimulation aufheben. PHHs wurden entweder mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) und IL-6 (10 ng/mL) oder mit diesen Zytokinen in Gegenwart des JAK-Inhibitors (0,5  $\mu$ M) für 24 Stunden behandelt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte die Bestimmung der CRP-, HP- und SOCS3-Expression mittels qRT-PCR. Die Behandlung der Hepatozyten mit dem JAK-Inhibitor blockierte vollständig die IL-1 $\beta$ - und IL-6-induzierte Expression der genannten Gene teilweise bis unter die basale Expressionsebene (**Abb.29**).



**Abb.29 qRT-PCR: Effekte einer JAK-Kinase-Inhibition auf die Expression verschiedener Akute Phase Proteine in PHH.**

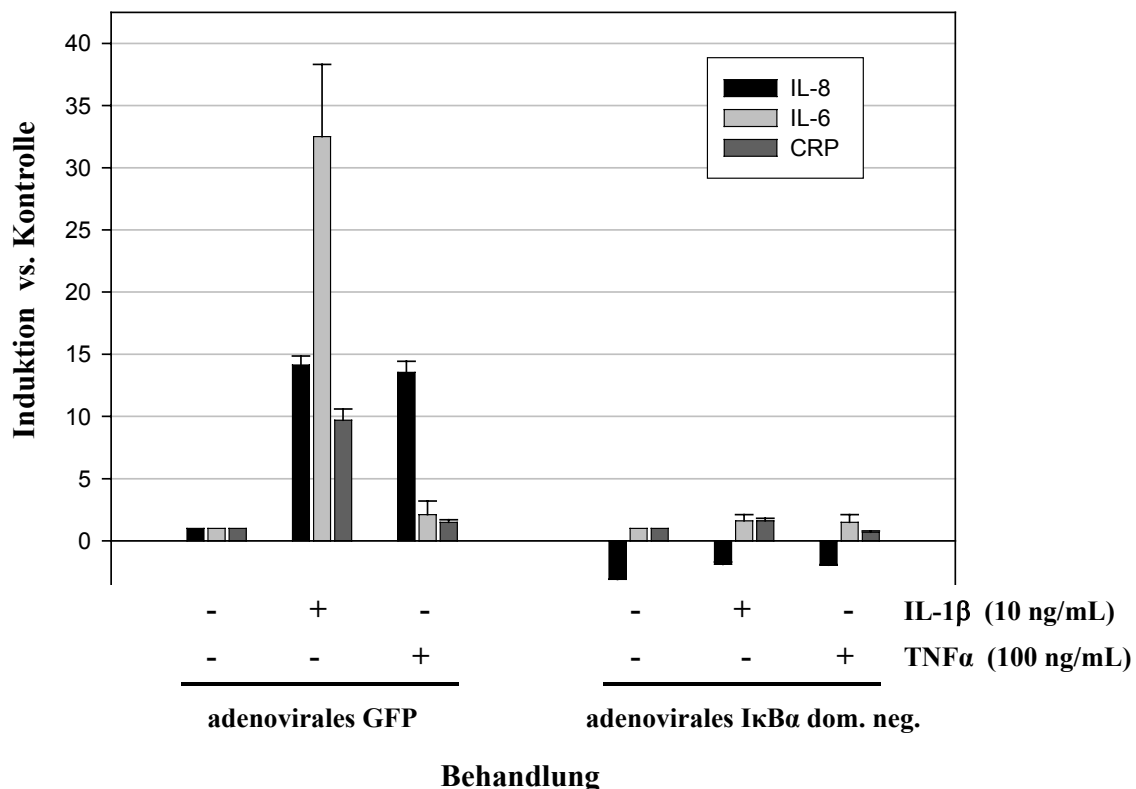
Der spezifische JAK-Kinase Inhibitor blockiert vollständig die IL-1 $\beta$ - und IL-6-induzierte CRP-, HP- und SOCS3-Expression.

### 3.5.2.6 Überexpression einer dominant-negativen Variante des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins in PHH

Zur Klärung der Frage, welcher Transkriptionsfaktor für die IL-1 $\beta$ -induzierte IL-6-Expression in PHH verantwortlich ist, wurde in PHH mittels adenoviralem Gentransfer eine dominant-negative Form des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins überexprimiert. Dieses Protein ist durch gezielte Mutation der Serine 32 und 36 nicht mehr durch übergeordnete Kinasen phosphorylierbar, so daß es

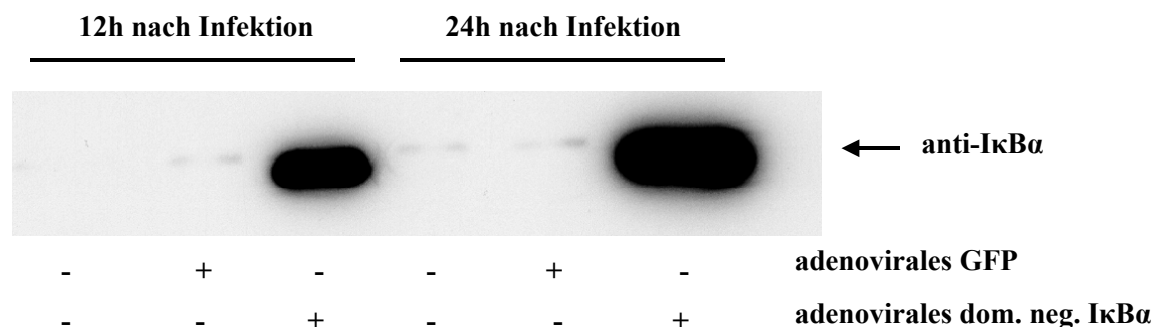


nicht mehr ubiquitinyliert und anschließend durch das Proteasom hydrolysiert werden kann. Dadurch kommt es zu einer Blockade der NF $\kappa$ B-Signaltransduktion da eine p50/p65-Kerntranslokation nicht mehr möglich ist (siehe Einleitung). Als Kontroll-Protein diente adenoviral transferiertes GFP. 48 Stunden nach Beginn des Gentransfers wurden die Zellen mit IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  stimuliert und nach weiteren 24 Stunden die Zellkulturüberstände entnommen und aus den Zellysaten Gesamt-RNA isoliert. Durch quantitative RT-PCR konnte erwartungsgemäß gezeigt werden, daß eine Blockade des NF $\kappa$ B-Signals durch dominant-negatives I $\kappa$ B $\alpha$  die IL-8-mRNA-Expression inhibierte (**Abb.30**). Ebenso wurde die IL-1 $\beta$ -induzierte IL-6-Transkription und in Folge dessen auch die CRP-mRNA-Bildung aufgehoben. Analog zu diesen Befunden ergab die Bestimmung der IL-6- und CRP-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen eine praktisch vollständige Hemmung der Synthese beider Proteine durch nicht-degradierbares I $\kappa$ B $\alpha$  (**Abb.31**). Die Expression von GFP wurde durch Fluoreszenzmikroskopie (**Abb.31b**) und die des dominant-negativen I $\kappa$ B $\alpha$  durch Western-Blot-Analyse (**Abb.32**) überprüft.



**Abb.30 qRT-PCR: Expression verschiedener Akute Phase Proteine nach Überexpression einer dominant-negativen Variante des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins in primären humanen Hepatozyten.** Dominant-negatives I $\kappa$ B $\alpha$  inhibiert vollständig die IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -induzierte IL-8-Expression und die IL-1 $\beta$ - ausgelöste IL-6- und CRP-Transkription.





**Abb.32 Western-Blot-Analyse:**

IκBα-Expression in primären humanen Hepatozyten nach adenoviralem Gentransfer.

### 3.5.3 Etablierung der Hepatomazelllinie Hep3B als Modell zur Untersuchung regulatorischer Mechanismen der Akuten Phase Reaktion

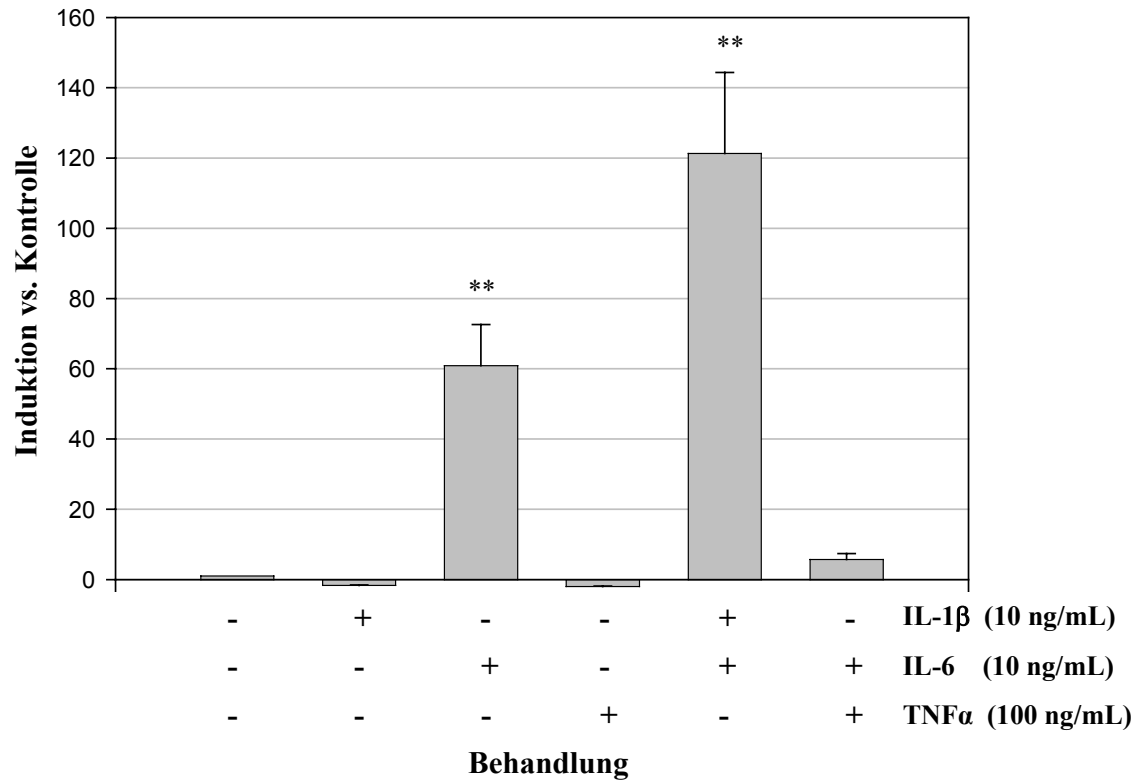
Im Gegensatz zur Hepatomazelllinie HepG2 exprimieren Hep3B-Zellen detektierbare Mengen CRP-mRNA, so daß diese Zellen ein geeignetes Modell zur Untersuchung verschiedener Mechanismen der Akuten Phase Reaktion darstellen, insbesondere da es sich bei dieser Zelllinie um eine einfach zu handhabende und kostengünstige Alternative zu PHH handelt. Als ein großer Nachteil dieser Zelllinie erwies sich die Tatsache, daß die von diesen Zellen gebildeten Mengen CRP-Proteins unterhalb der Nachweisgrenze der z.Zt. verfügbaren CRP-ELISA liegen und sich deshalb die Quantifizierung des exprimierten CRPs auf Proteinebene experimentell als zu aufwendig und unpräzise darstellte. Deshalb konnte einzig die Bildung von CRP-mRNA als Maß für die CRP-Transkription herangezogen werden. Als Vorteil der Hep3B-Zelllinie erwies sich, daß sie im Gegensatz zu PHHs, deren starke interindividuelle Variationen in der Genexpression die Aufklärung von Signaltransduktionskaskaden erschweren, ein konstantes Genexpressionsprofil widerspiegeln.

#### 3.5.3.1 Behandlung von Hep3B-Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen

Eine 24 stündige Behandlung von Hep3B-Zellen mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1β (10 ng/mL), IL-6 (10 ng/mL) und TNFα (100 nM) zeigte, dass IL-6-Stimulation zu einer signifikant erhöhten CRP-Transkription führte (**Abb.33**).

IL-1β und TNFα bewirkten eine Absenkung der CRP-mRNA-Mengen unter die basale Expressionsebene. Die Behandlung der Hep3B-Zellen mit der Kombination aus IL-1β und

IL-6 wirkte sich synergistisch auf die Expression der CRP-mRNA aus, während eine Kombination aus TNF $\alpha$  und IL-6 nur eine minimal erhöhte CRP-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen zur Folge hatte.



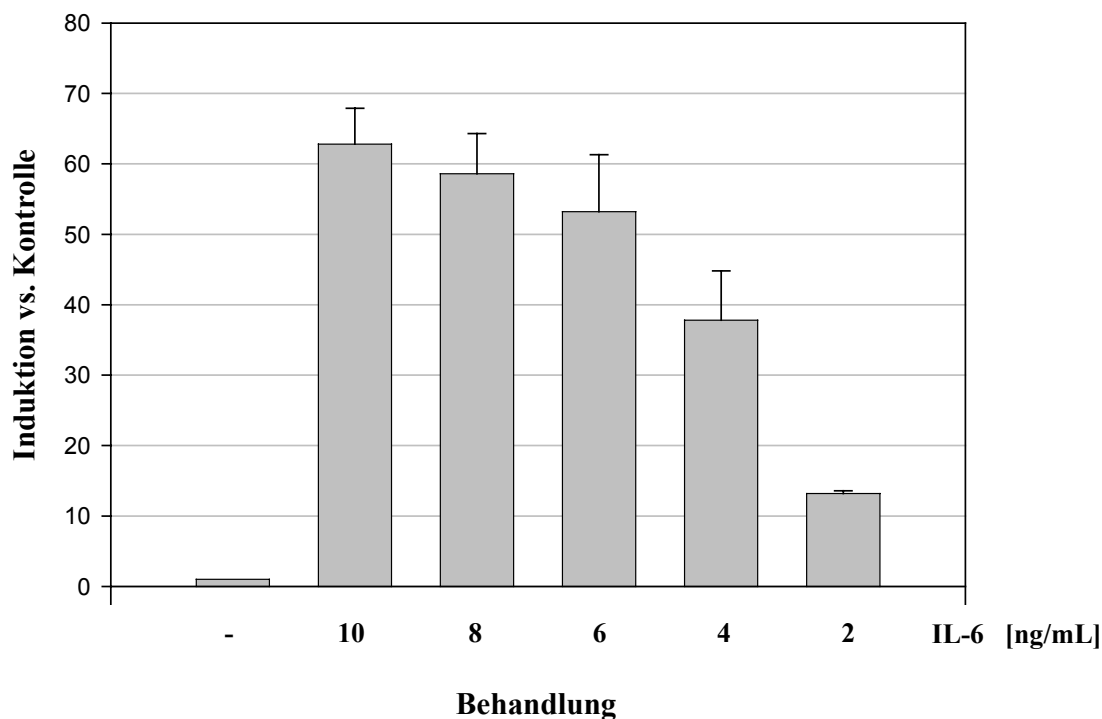
**Abb.33 qRT-PCR: CRP-Expression in Hep3B-Zellen nach Zytokinbehandlung.**

\*\* = hochsignifikante Induktion ( $p < 0,001$ );

### 3.5.3.2 Die IL-6-induzierte Signaltransduktion in Hep3B-Zellen

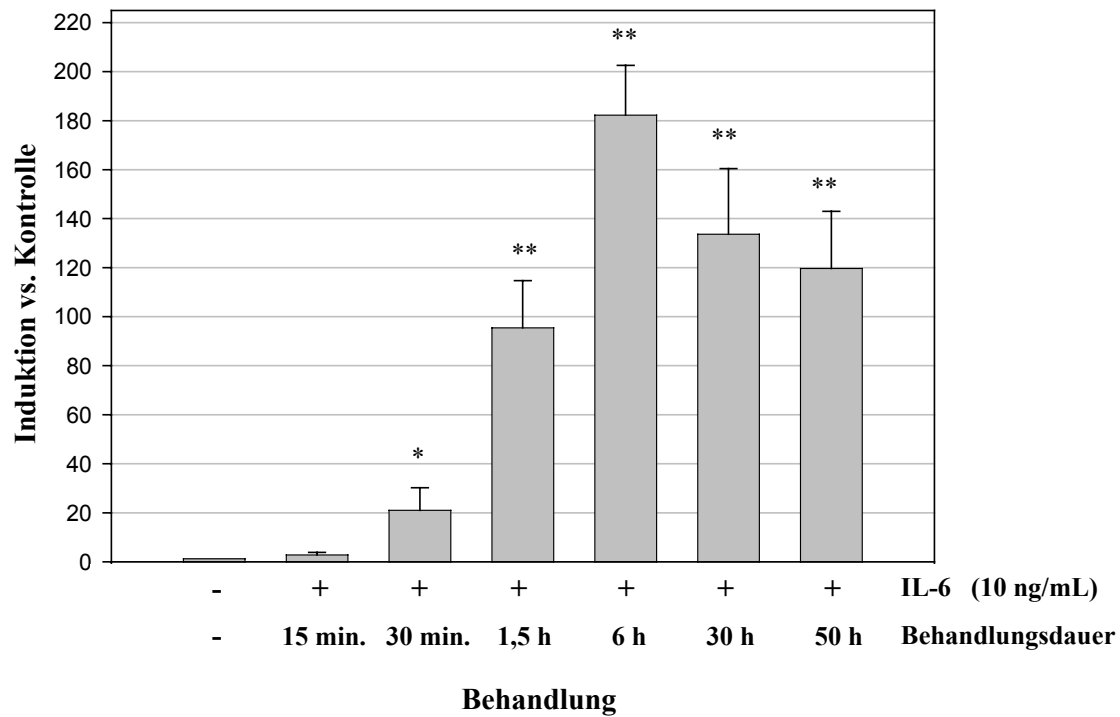
#### 3.5.3.2.1 Validierung der experimentellen Bedingungen

Zur Ermittlung der idealen Versuchsbedingungen wurden Hep3B-Zellen mit unterschiedlichen Mengen IL-6 im Konzentrationsbereich zwischen 2-10 (ng/mL) für 24 Stunden behandelt (**Abb.34**). Mengen von 6-10 (ng/mL) induzierten eine maximale CRP-Expression im Bereich von ca. 50-60-fach im Vergleich zu unbehandelten Zellen, sodaß in folgenden Experimenten IL-6 Konzentrationen von (10 ng/mL) zur Stimulation der Hep3B-Zellen zum Einsatz kamen. Zur Bestimmung der CRP-Expressionskinetik wurden Hep3B-Zellen unterschiedlich lange mit IL-6 (10 ng/mL) behandelt, Gesamt-RNA wurde isoliert und die CRP-Expression mittels qRT-PCR quantifiziert (**Abb.35**). Bereits drei Stunden nach Behandlungsbeginn war eine signifikant erhöhte CRP-Transkription detektierbar, die nach sechs Stunden ein Maximum erreichte. Auch nach 30 und 50 Stunden Behandlungsdauer lagen hochsignifikant erhöhte CRP-mRNA-Spiegel vor.



**Abb.34 qRT-PCR: CRP-Expression in Hep3B-Zellen.**

Die Interleukin-6-abhängige CRP-Expression steigt proportional zur eingesetzten IL-6-Konzentration.



**Abb.35 qRT-PCR: CRP-Expression in Hep3B-Zellen.**

Die Interleukin-6-induzierte CRP-Expression steigt innerhalb der ersten sechs Behandlungsstunden kontinuierlich an und bleibt anschließend bis zum Ende der Messung nach 50 Stunden gleichmäßig stark erhöht.

\* = signifikante Induktion ( $p < 0,05$ ); \*\* = hochsignifikante Induktion ( $p < 0,001$ );

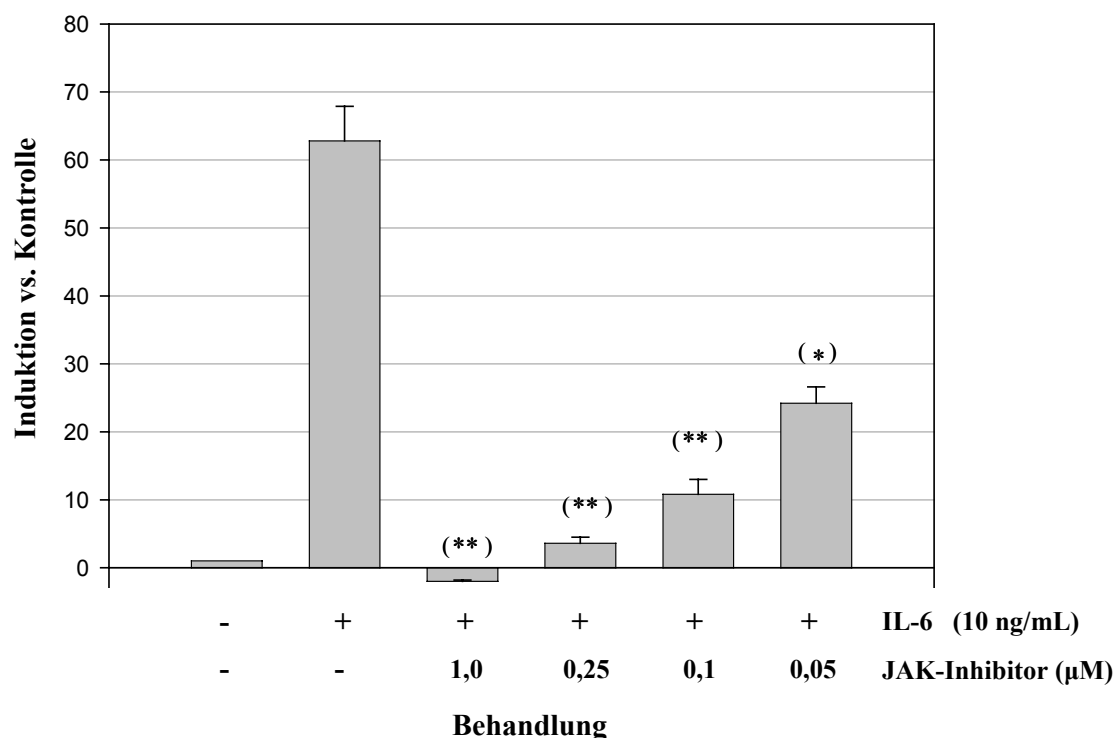
### 3.5.3.2.2 Inhibition potentiell an der IL-6-Signaltransduktion beteiligter Proteine

Unter Verwendung chemischer Kinase-Inhibitoren und der siRNA-Technologie sollten im folgenden die Komponenten der IL-6-Signaltransduktion in Hep3B-Zellen identifiziert werden. Als literaturbekannte Faktoren kamen in diesem Kontext die Vertreter der JAK-Kinase-Familie und der Transkriptionsfaktor STAT3 in Frage (siehe Einleitung).

#### 3.5.3.2.2.1 Effekte einer JAK-Kinase Inhibition auf die CRP-Expression in Hep3B-

##### Zellen

Zunächst wurde die IL-6-induzierte CRP-Expression in Hep3B-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen eines spezifischen JAK-Kinase-Inhibitors untersucht (**Abb.36**). Als Vergleich dienten IL-6-behandelte bzw. unbehandelte Hep3B-Zellen. Bereits in Konzentrationen von 0,05  $\mu\text{M}$  inhibierte der JAK-Kinase Inhibitor zu ca. 50 % die IL-6-induzierte CRP-Expression. Eine Inhibitorkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  im Zellkulturmedium senkte die CRP-mRNA-Expression unter die Ebene, die in unbehandelten Zellen zu finden war.

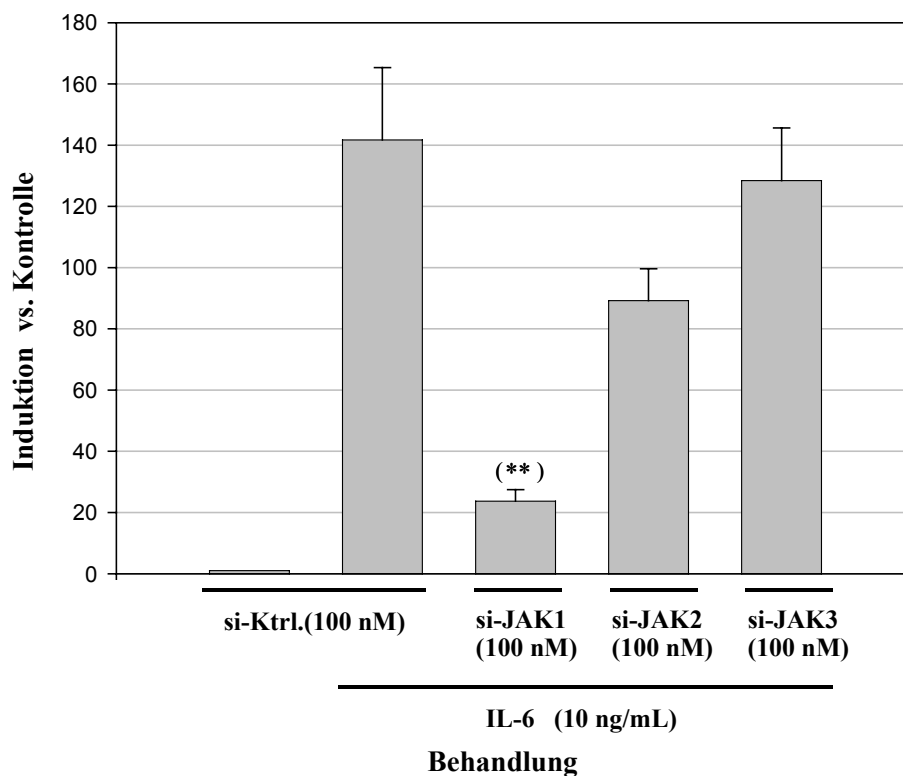


**Abb.36 qRT-PCR: JAK-Kinase Inhibition in Hep3B-Zellen.**

Der JAK-Kinase Inhibitor hemmt in Hep3B die IL-6-induzierte CRP-Expression mit einer  $\text{IC}_{50} < 50\text{nM}$ . (\*) = signifikante Hemmung ( $p < 0,05$ ); (\*\*) = hochsignifikante Hemmung ( $p < 0,001$ );

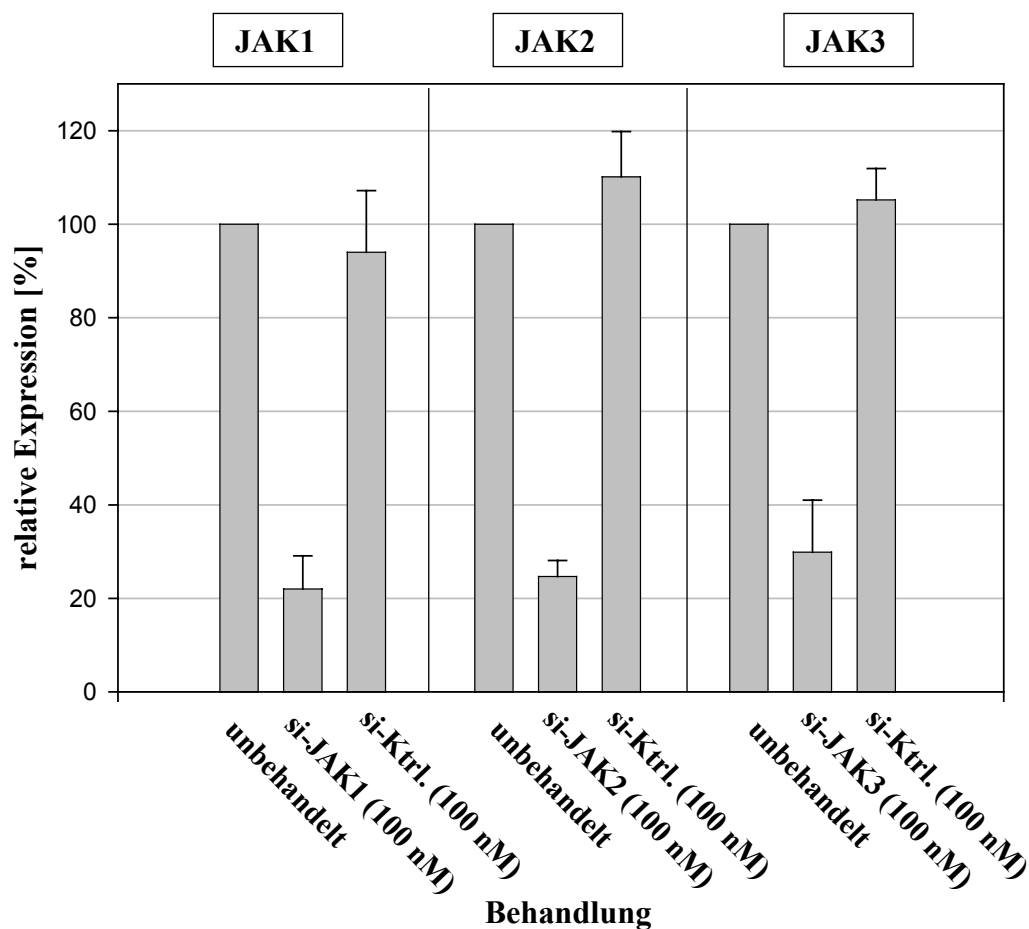
### 3.5.3.2.2.2 Transfektion von Hep3B-Zellen mit gegen JAK-Kinasen gerichtete siRNA-Oligonukleotide.

Die Verwendung von siRNAs gegen JAK1, JAK2 und JAK3 sollte die Identifizierung der für die IL-6-Signaltransduktion kritischen JAK-Isoform ermöglichen. Die relative Expression der einzelnen JAK-Kinasen in Hep3B-Zellen im Vergleich zu GAPDH ist in **Tab.6** wiedergegeben. Hierzu wurden Hep3B-Zellen 48 Stunden vor Beginn der IL-6-Behandlung mit den entsprechenden siRNAs liposomal transfiziert. Zum Einsatz kamen hierbei vorvalidierte siRNA-Gemische der Firma Dharmacon/Perbio (Chicago, USA) bestehend aus vier individuellen Sequenzen. 24 Stunden nach Behandlungsbeginn mit IL-6 wurde die Gesamt-RNA isoliert und die CRP-Expression durch qRT-PCR bestimmt. Den stärksten inhibitorischen Effekt in bezug auf die CRP-Transkription zeigte die gegen JAK1 gerichtete siRNA (**Abb. 37**). Die Inhibition der JAK2-Kinase führte zu einer 50 %igen Inhibition der CRP-mRNA-Synthese, während JAK3 scheinbar keine Rolle bei der IL-6-induzierten CRP-Synthese spielte. Die Effektivität der Inhibition auf Ebene der Zielkinasen wurde mittels qRT-PCR überprüft und ist in **Abb. 38** dokumentiert.



**Abb.37 qRT-PCR: CRP-Expression in si-JAK1-, si-JAK2- und si-JAK3-transfizierten Hep3B.**  
(\*\*) = hochsignifikante Hemmung ( $p < 0,001$ );





**Abb. 38 qRT-PCR: JAK1-, JAK2- und JAK3-Expression in Hep3B nach siRNA-Transfektion.**  
Die Expression der drei JAK-Isoformen konnte mit den entsprechenden siRNA-Oligonukleotiden effektiv inhibiert werden.

**Tab.6 Relative Expression verschiedener JAK-Isoformen in Hep3B-Zellen.**

	GAPDH	JAK1	JAK2	JAK3
<b>relative Expression</b>	<b>100</b>	<b>25,6</b>	<b>0,6</b>	<b>0,01</b>
<b>Std.Abweichung (+/-)</b>	<b>-</b>	<b>4,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,01</b>

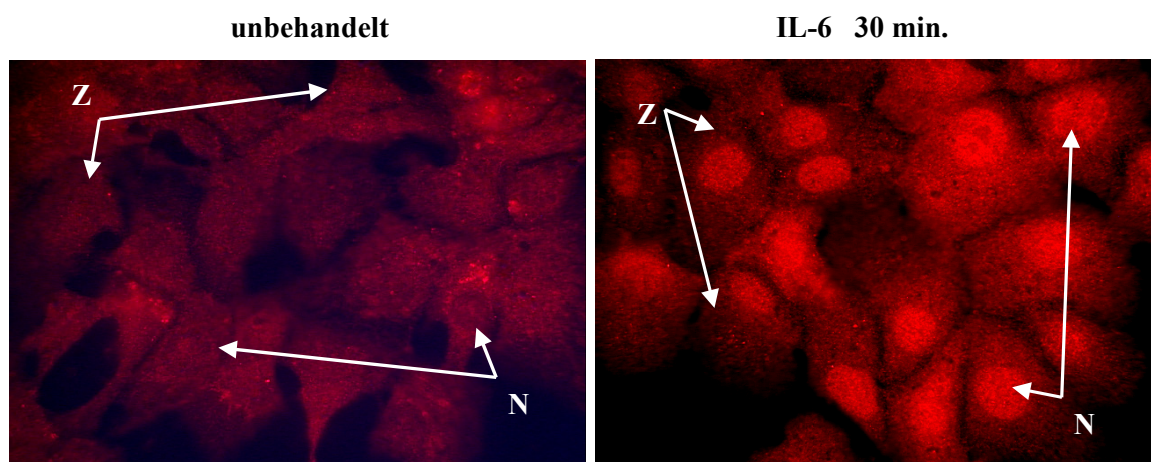
Unter Verwendung der mittels qRT-PCR ermittelten ct-Werte\* für GAPDH und der ct-Werte der JAK-Kinasen wurde die relative Expression der einzelnen JAK-Isoformen errechnet. Den relativen Expressionswerten liegt die Annahme zugrunde, dass die GAPDH Expression 100% entspricht.

\* Der ct-Wert („cycle-threshold“), der bei der qRT-PCR ermittelt wird, gibt an nach wieviel PCR-Zyklen die detektierte Fluoreszenz der verwendeten TaqMan-Sonde® einen definierten Schwellenwert überschreitet. Er wird zur Errechnung der relativen mRNA-Expression herangezogen und kann auch zum Vergleich der basalen Genexpression dienen.

### 3.5.3.2.2.3 Transfektion von Hep3B-Zellen mit gegen STAT3 gerichtete siRNA-Oligonukleotide

Innerhalb der IL-6-Signaltransduktionskaskade läuft die Signalübertragung von der Ebene der JAK-Kinasen weiter in Richtung des Transkriptionsfaktors STAT3 (siehe Einleitung). Aus diesem Grund wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob auch in Hep3B-Zellen dieser Transkriptionsfaktor für die Expression der IL-6-induzierten Gene verantwortlich ist.

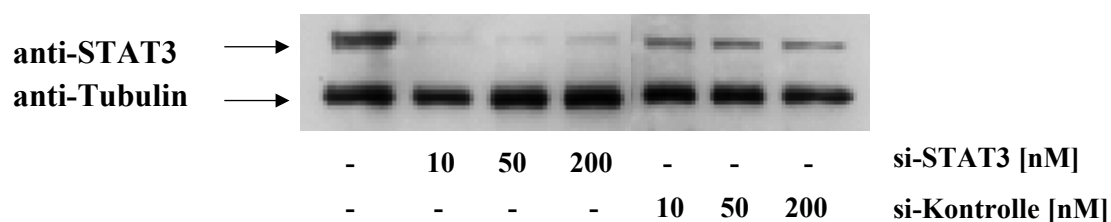
Die Immunohistochemische Detektion von STAT3 in unbehandelten und 30 Minuten mit IL-6 inkubierten Zellen zeigte, daß zytosolisches STAT3 nach Aktivierung durch IL-6 in den Zellkern transloziert (**Abb.39**).



**Abb.39 Immunohistochemische Detektion von STAT3-Protein.** Behandlung von Hep3B-Zellen mit IL-6 induziert eine Translokation des zytosolischen STAT3 in den Nukleus.

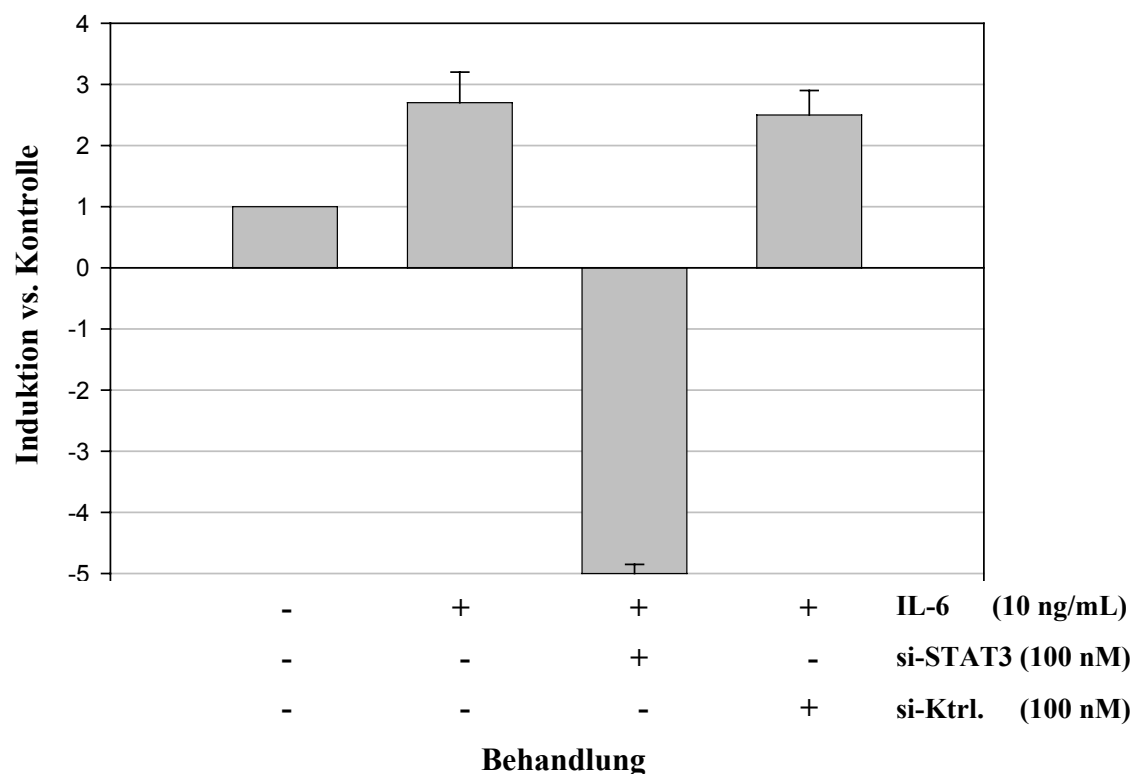
Da STAT3 in Hep3B-Zellen durch Interleukin-6-Behandlung aktiviert wurde und in den Kern translozierte sollte im folgenden die Rolle dieses Transkriptionsfaktors in der IL-6-induzierten Genexpression untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Hep3B-Zellen mit verschiedenen siRNAs in den Konzentrationen 10 nM, 50 nM und 200 nM liposomal transfiziert. 48 Stunden nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen lysiert und eine Western-Blot-Analyse zur Detektion der STAT3 Protein Menge durchgeführt (**Abb.40**). Desweiteren wurde die inhibitorische Wirkung der siRNA auf die STAT3 mRNA Expression mittels qRT-PCR belegt (**Abb.41**). Die verwendete siRNA senkte die IL-6-induzierte STAT3-mRNA-Bildung unter die basale Expressionsebene der unbehandelten Zellen. Die siRNA Sequenz, die am effektivsten die STAT3 Expression auf Protein- und mRNA-Ebene inhibierte, wurde in folgenden Experimenten in einer Konzentration von 100 nM verwendet. Im folgenden wurde der Effekt der STAT3-Inhibition durch den Einsatz der entsprechenden siRNA auf die IL-6-induzierte CRP-Expression evaluiert. Zu diesem Zweck

wurden Hep3B-Zellen 48 Stunden vor Beginn der IL-6-Behandlung mit der beschriebenen siRNA gegen STAT3 liposomal transfiziert. Nach 24 stündiger Stimulation der Zellen mit IL-6 wurde die Gesamt-RNA isoliert und eine qRT-PCR zur Detektion der CRP-Expression durchgeführt (**Abb.42**). Hep3B-Zellen, die zuvor mit siRNA gegen STAT3 transfiziert worden waren, zeigten praktisch keine CRP-Expression in Folge einer IL-6-Behandlung, wohingegen die Transfektion mit der siRNA-Kontrolle keinen signifikanten Einfluß auf die IL-6-abhängige CRP-Transkription ausübte.



**Abb.40 Western-Blot-Analyse: STAT3-Expression in Hep3B-Zellen.**

Die Expression des STAT3-Proteins nach Transfektion unterschiedlicher si-STAT3-Konzentrationen wurde bestimmt.



**Abb.41 qRT-PCR: STAT3-Expression in Hep3B-Zellen.**

Die STAT3-Expression nach Transfektion unterschiedlicher si-STAT3-Konzentrationen wurde bestimmt.

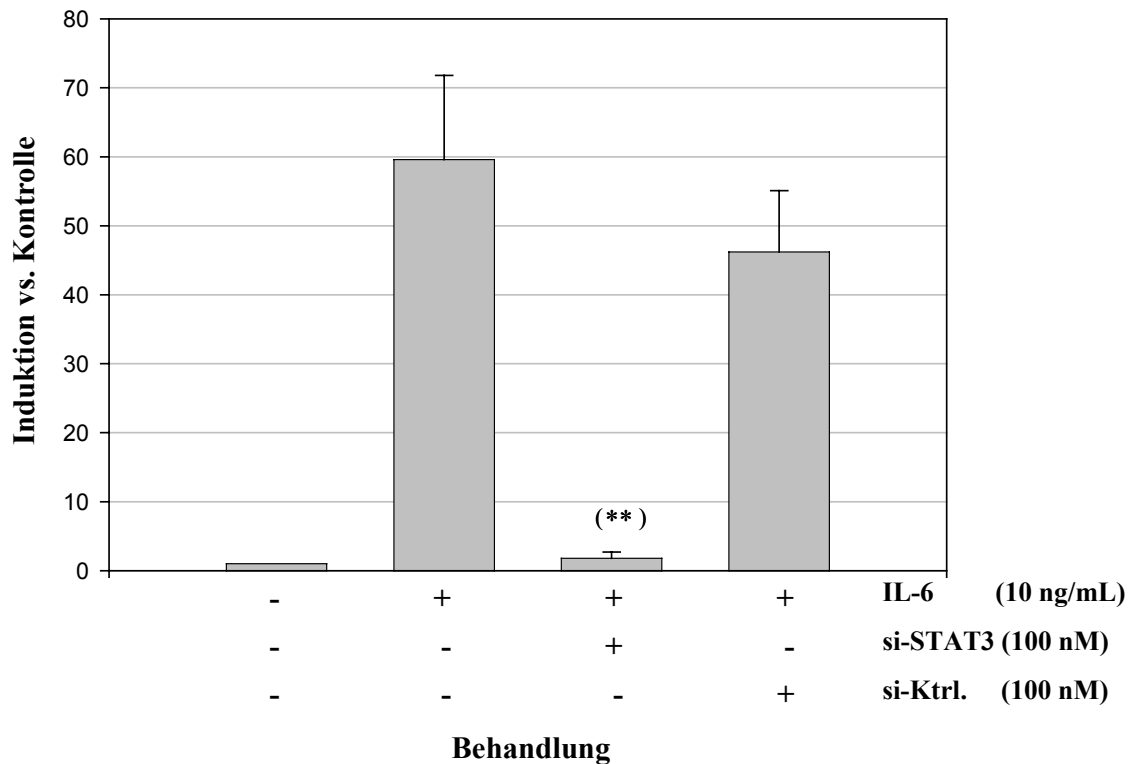


Abb.42 qRT-PCR: CRP-Expression in Hep3B-Zellen nach si-STAT3-Transfektion. (\*\*)= hochsignifikante Hemmung ( $p < 0,001$ );

#### 3.5.3.2.2.4 Transfektion von Hep3B-Zellen mit siRNA-Oligonukleotiden, die gegen verschiedene C/EBP-Isoformen gerichtet waren.

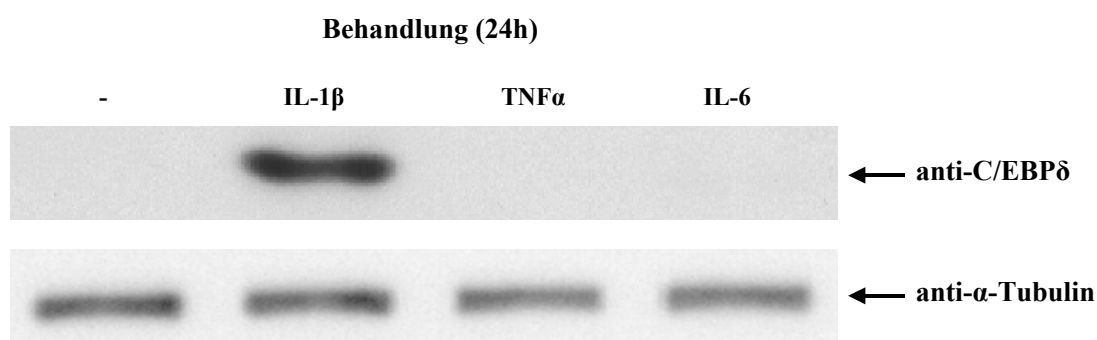
Eine weitere Gruppe von Transkriptionsfaktoren die im Zusammenhang der Akuten Phase Reaktion des Körpers als bedeutsam diskutiert werden, ist die Familie der CCAAT/Enhancer Binding Proteine (C/EBP-Familie) (siehe Einleitung). Die einzelnen Isoformen der C/EBP Familie werden in unbehandelten Hep3B-Zellen unterschiedlich stark exprimiert (Tab.7). C/EBP $\alpha$ - und C/EBP $\beta$ -Protein läßt sich in ruhenden Hep3B-Zellen in größeren Mengen detektieren während C/EBP $\delta$ -Protein in unbehandelten Zellen mittels Western-Blot-Analyse nicht nachweisbar ist und erst nach IL-1 $\beta$  Behandlung in detektierbaren Mengen exprimiert wird (Abb.43). Eine potentielle Beteiligung von C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  oder C/EBP $\delta$  an der IL-6-induzierten Signaltransduktion in Hep3B-Zellen wurde im folgenden untersucht. Zu diesem Zweck erfolgte in Hep3B eine liposomale Transfektion verschiedener siRNA-Oligonukleotide gegen die Isoformen C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$ . Keine der eingesetzten siRNA-Sequenzen, die gegen C/EBP $\beta$  gerichtet waren, konnte effektiv die Expression dieses Proteins

unterdrücken. Auch mehrmalige Transfektionen in Folge mit der entsprechenden siRNA blieben erfolglos, so daß im folgenden auf den Einsatz von siRNAs gegen C/EBP $\beta$  verzichtet werden mußte. Die mRNA- und Proteinexpression der Isoformen C/EBP $\alpha$  und C/EBP $\delta$  ließen sich effektiv inhibieren (**Abb.44 & 47**), so daß die entsprechenden siRNA-Sequenzen im weiteren Verlauf eingesetzt werden konnten, um ihre Wirkung auf die Expression des IL-6-Zielgens CRP zu evaluieren. Hierzu wurden Hep3B-Zellen mit verschiedenen siRNA-Oligonukleotiden gegen C/EBP $\alpha$  und C/EBP $\delta$  transfiziert und anschließend die CRP-Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR bestimmt. Zwei der gegen C/EBP $\alpha$  gerichtete siRNA-Sequenzen inhibierten die IL-6-induzierte CRP-Expression, eine dritte, die auch zuvor nicht in der Lage war, die Expression des C/EBP $\alpha$  Proteins hinreichend zu unterdrücken, hatte keinerlei Effekt auf die CRP-Transkription (**Abb.45**). Die Transfektion von si-C/EBP $\delta$  hemmte ebenfalls hochsignifikant keinerlei die IL-6- induzierte CRP-Expression (**Abb.46**).

**Tab.7 Relative Expression verschiedener C/EBP-Isoformen in Hep3B-Zellen.**

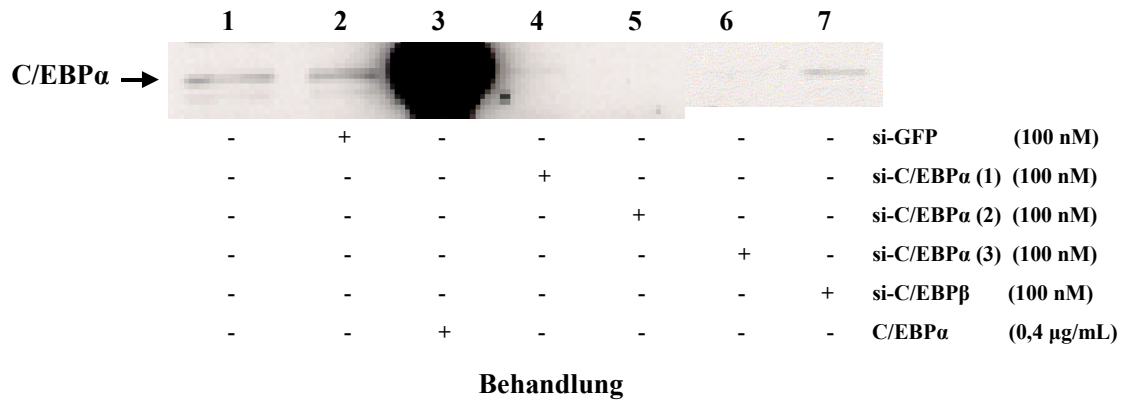
	GAPDH	C/EBP $\alpha$	C/EBP $\beta$	C/EBP $\delta$
relative Expression	100	102,1	1,0	0,3
Std.Abweichung (+/-)	-	20,5	0,1	0,01

Unter Verwendung der mittels qRT-PCR ermittelten ct-Werte für GAPDH und der C/EBP-ct-Werte wurde die relative Expression der einzelnen C/EBP-Isoformen errechnet. Den relativen Expressionswerten liegt die Annahme zugrunde, dass die GAPDH Expression 100% entspricht.



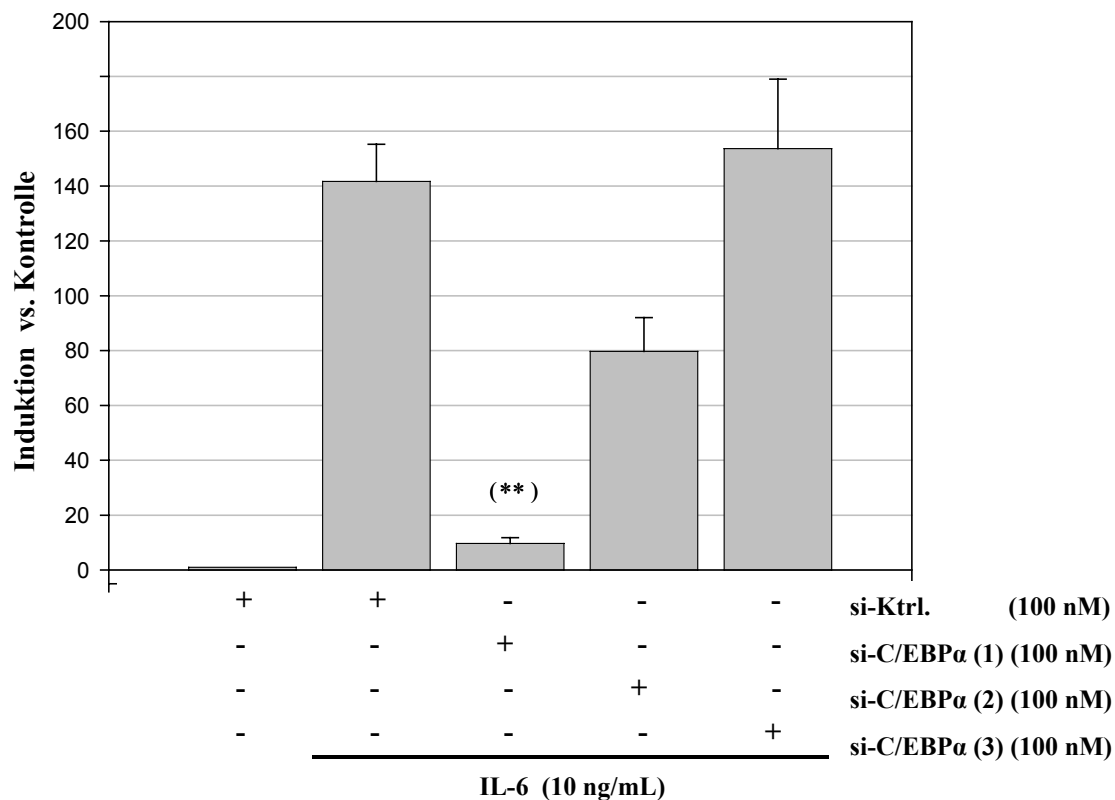
**Abb.43 Western-Blot-Analyse: C/EBP $\delta$ -Expression in Hep3B-Zellen.**

C/EBP $\delta$  ist in unbehandelten Hep3B nicht detektierbar. Nach Behandlung mit IL-1 $\beta$  wird C/EBP $\delta$  exprimiert. TNF $\alpha$ - und IL-6-Stimulation haben keinen Effekt auf die C/EBP $\delta$ -Expression.



**Abb.44 Western-Blot-Analyse: C/EBPα-Expression in Hep3B-Zellen.**

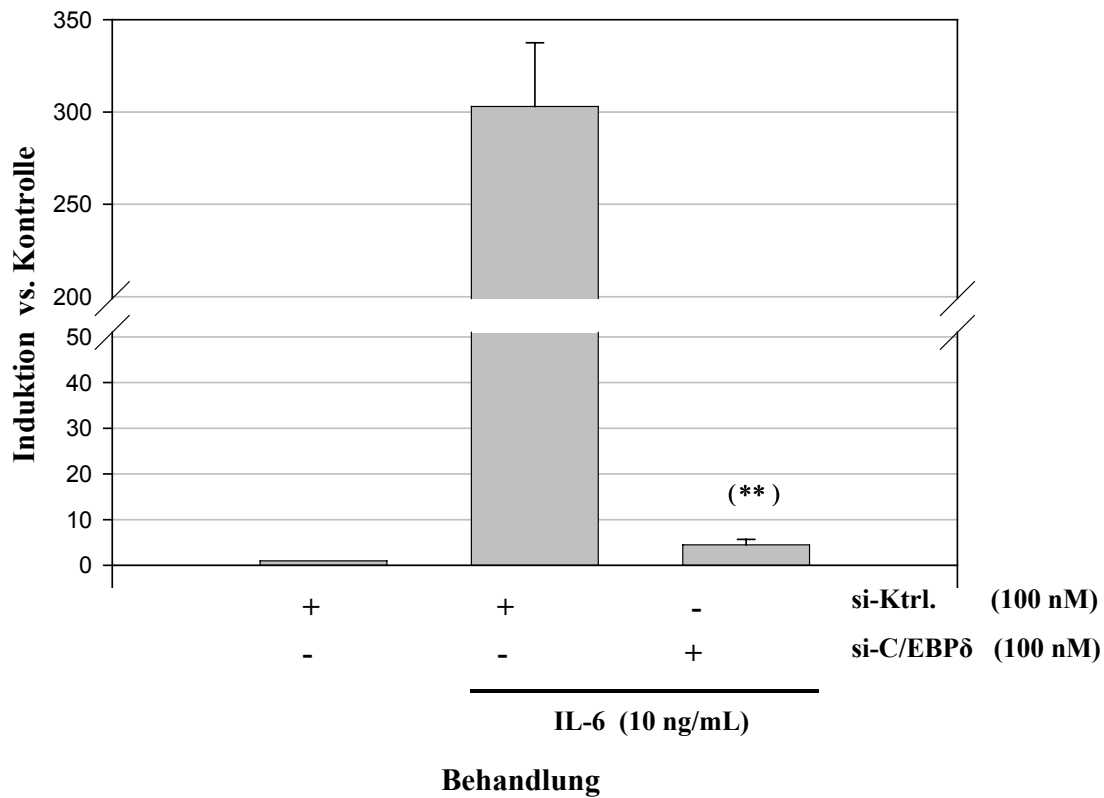
Die Expression des C/EBPα-Proteins nach Transfektion mit unterschiedlichen si-C/EBPα wurde bestimmt (Spalte 4-6). Als Kontrollen wurden si-GFP (Spalte 1) und si-C/EBPβ transfiziert (Spalte 7) bzw. C/EBPα überexprimiert (Spalte 3).



**Abb.45 qRT-PCR: CRP-Expression in Hep3B-Zellen nach si-C/EBPα-Transfektion.**

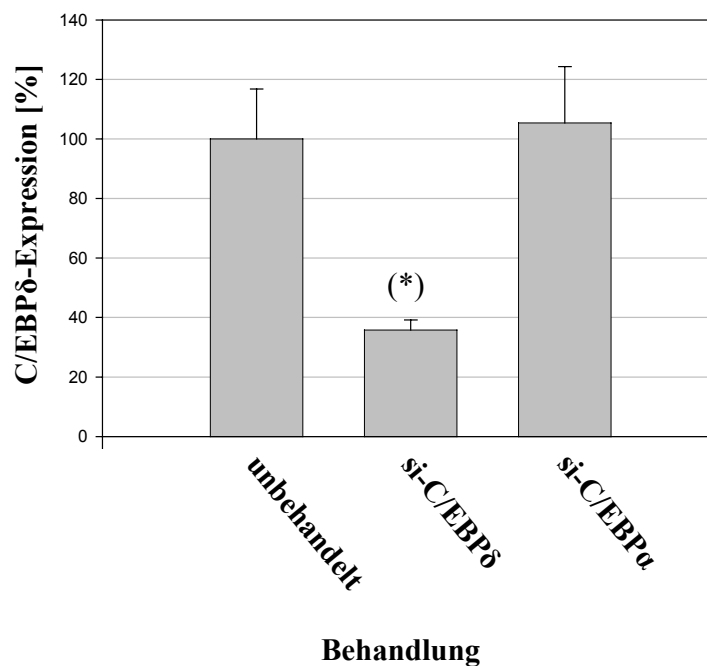
Die IL-6-induzierte CRP-Expression konnte effektiv durch die Transfektion mit zwei unterschiedlichen siRNA-Sequenzen gegen C/EBPα inhibiert werden.

(\*\*) = hochsignifikante Hemmung ( $p < 0,001$ );



**Abb.46 qRT-PCR: CRP-Expression in Hep3B-Zellen nach si-C/EBPδ-Transfektion.**

Die Inhibition der C/EBPδ-Expression mittels siRNA-Technologie hatte in Hep3B keinen Einfluß auf die IL-6-induzierte CRP-Transkription. (\*\*) = hochsignifikante Hemmung ( $p \leq 0,001$ );

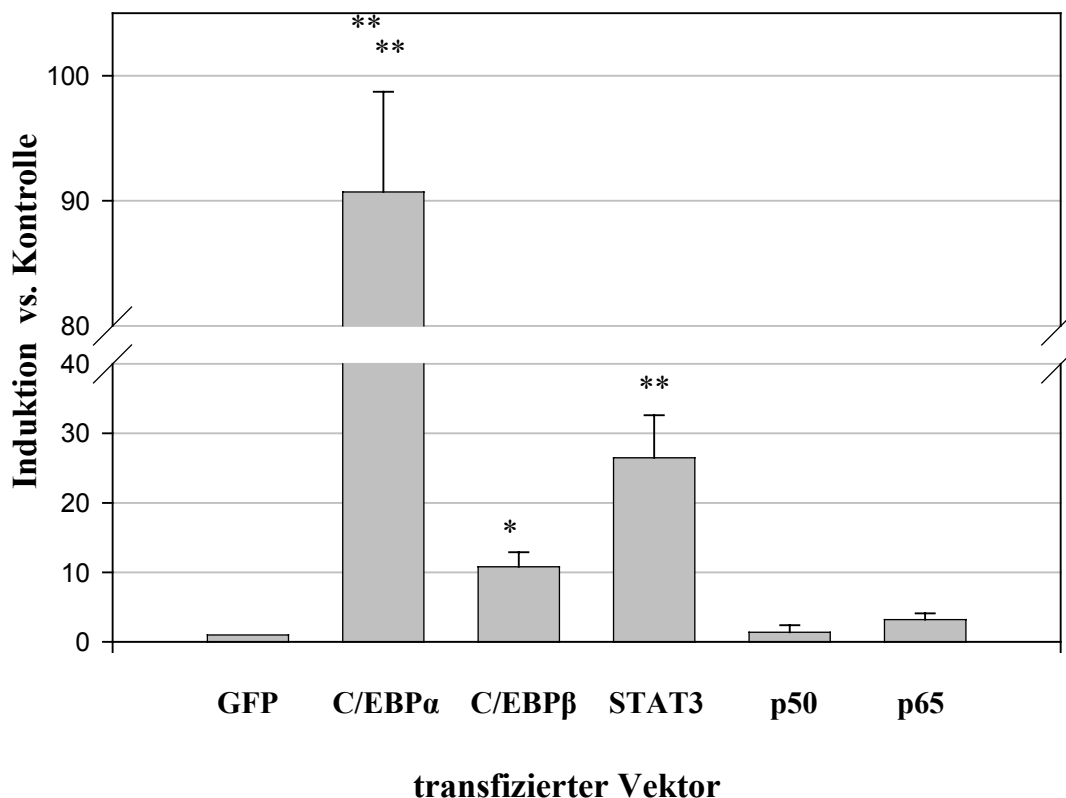


**Abb.47 qRT-PCR: Relative Expression der C/EBP-Isoform delta in Hep3B-Zellen unter basalen Bedingungen und nach siRNA-Transfektion. (\*) = signifikante Hemmung  $p \leq 0,05$**

### 3.5.3.2.3 Überexpression potentiell an der IL-6-Signaltransduktion beteiligter

#### Proteine

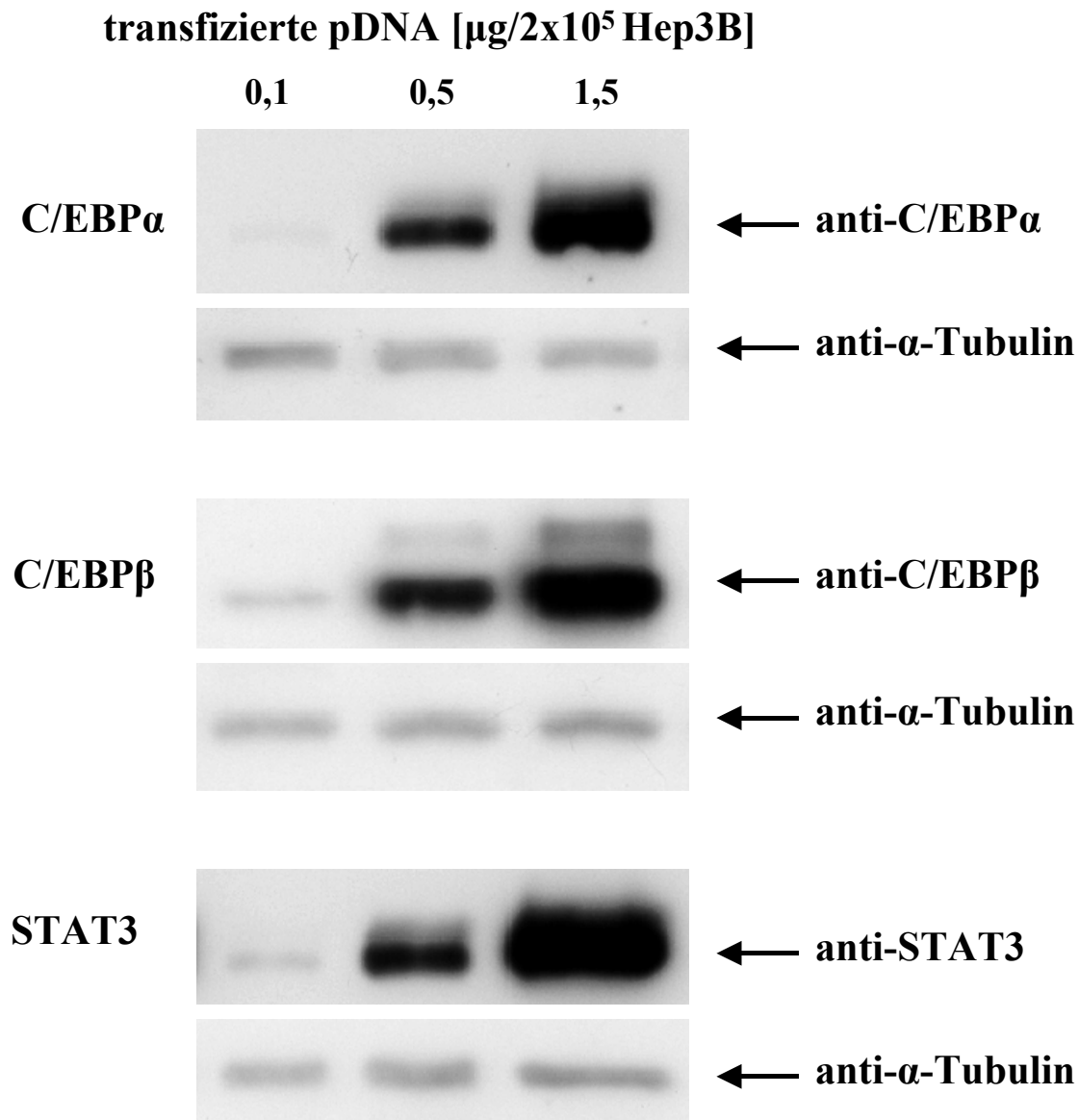
Die Transkriptionsfaktoren C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  und STAT3, deren Aktivität für die Expression verschiedener IL-6-abhängiger APPs verantwortlich ist, sowie die NF $\kappa$ B-Untereinheiten p50/NF $\kappa$ B1 und p65/RelA wurden in Hep3B-Zellen überexprimiert. 48 Stunden nach Transfektion der entsprechenden Plasmid-DNA wurde aus den Zellen Gesamt-RNA isoliert und die Auswirkungen der Überexpression auf die CRP-Transkription mit Hilfe der qRT-PCR ermittelt (**Abb.48**). Vermehrt gebildetes C/EBP $\alpha$  erwies sich als hochpotenter Induktor der CRP-Transkription (91-fach  $\pm$  8). Eine Überexpression von STAT3 oder C/EBP $\beta$  führte zu einer schwächeren aber dennoch signifikant vermehrten CRP-mRNA-Expression (27-fach  $\pm$  4,5 bzw. 10,5-fach  $\pm$  1,5). Die forcierte Expression der NF $\kappa$ B-Untereinheiten p50/NF $\kappa$ B1 oder p65/RelA übte keine signifikanten Effekte auf die CRP-Transkription aus.



**Abb.48 qRT-PCR: CRP-Expression in Hep3B nach Überexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren.** Die vermehrte Expression von C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  oder STAT3 induziert die CRP-Transkription, wohingegen eine Überexpression von p50/NF $\kappa$ B1 oder p65/RelA keinen Einfluß hat. \* = signifikante Induktion ( $p \leq 0,05$ ); \*\* = hochsignifikante Induktion ( $p \leq 0,001$ );



Zur Kontrolle der verstärkten Protein-Synthese wurden Zellysate von Hep3B-Zellen, die zuvor mit unterschiedlichen Mengen Plasmid-DNA transfiziert worden waren, der Western-Blot-Analyse unterzogen. Alle untersuchten Transkriptionsfaktoren wurden nach Transfektion mit den entsprechenden Vektoren verlässlich überexprimiert (**Abb.49 und Abb.56**).



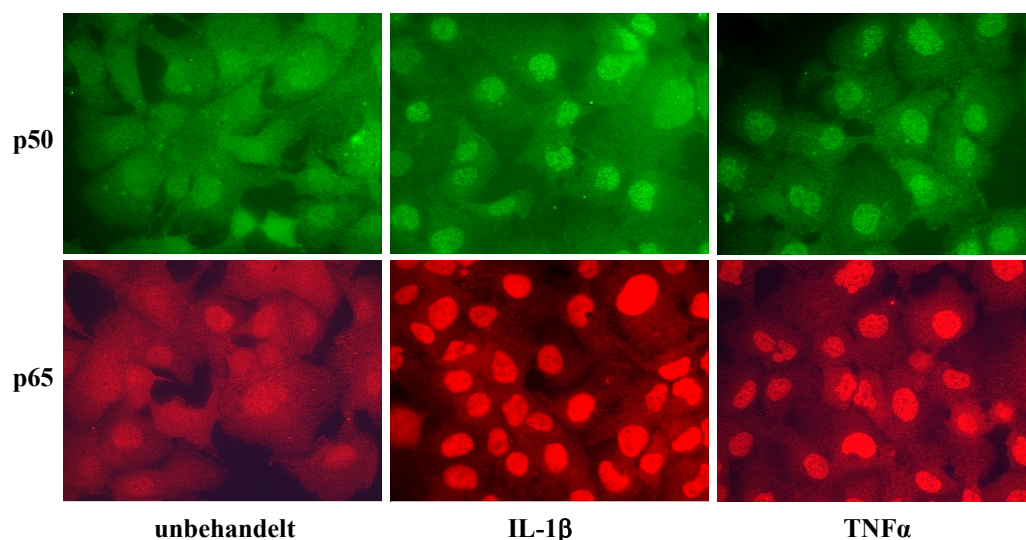
**Abb.49 Western-Blot-Analyse.** Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren in Hep3B nach liposomaler Transfektion mit den entsprechenden Expressionsvektoren. Die Detektion von  $\alpha$ -Tubulin diente als Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge.

### 3.5.3.3 Die IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ - induzierte Signaltransduktion in Hep3B-Zellen

Auch wenn in Hep3B-Zellen die CRP-Expression nicht durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  induziert werden konnte, so sollten in dieser Arbeit doch die durch diese Faktoren aktivierten Signaltransduktionswege untersucht werden, insbesondere da eine Reihe anderer wichtiger Akute Phase Proteine durch Behandlung mit diesen Zytokinen induziert wurden. Wie bereits unter Kapitel 3.10 beschrieben, wird die Expression einzelner Gencluster in gleichem Maße durch die Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  induziert, während andere Gene nur durch IL-1 $\beta$  und nicht TNF $\alpha$ , oder umgekehrt aktiviert wurden. Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den von IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  aktivierten Signaltransduktionswegen zu entschlüsseln, wurde zunächst systematisch unter Zuhilfenahme der siRNA Technologie die NF $\kappa$ B-Aktivität inhibiert, bzw. durch Überexpression der NF $\kappa$ B-Untereinheiten p50/NF $\kappa$ B1 und p65/RelA eine erhöhte NF $\kappa$ B-Aktivität erzeugt.

#### 3.5.3.3.1 Immunohistochemische Detektion von p50/NF $\kappa$ B1 und p65/RelA in Hep3B

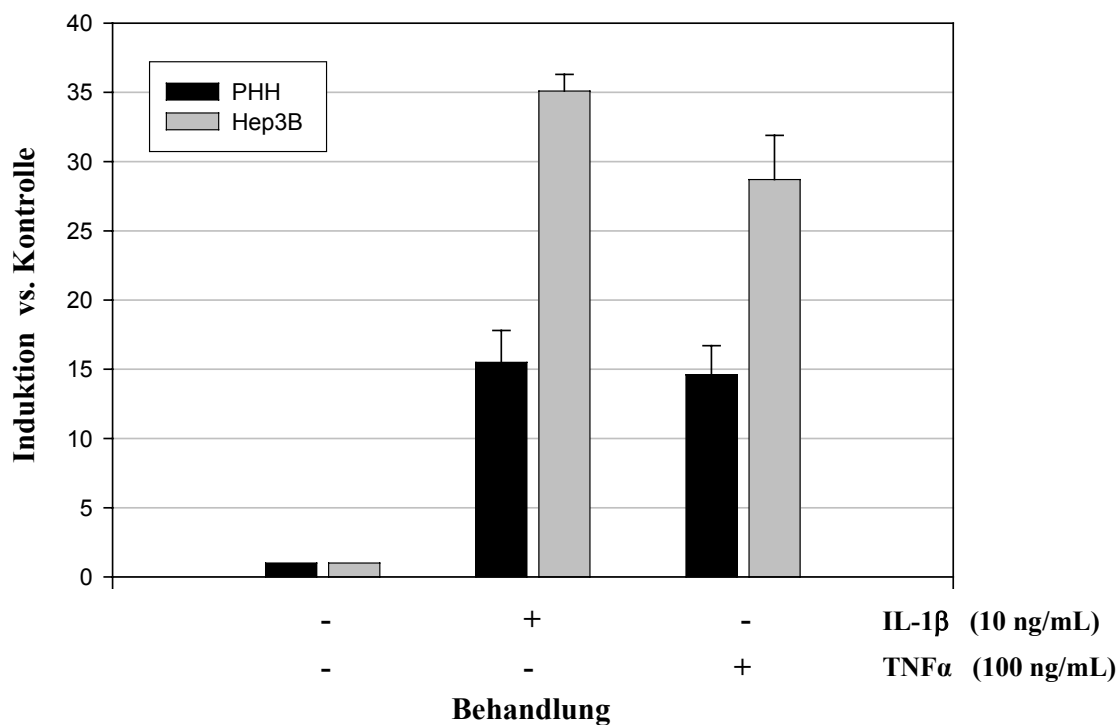
Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B wird durch Behandlung mit IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  aktiviert (siehe Einleitung), so daß die NF $\kappa$ B-Untereinheiten p50/NF $\kappa$ B1 und p65/RelA, die in nicht aktivierten Zellen zytosolisch lokalisiert sind, in den Zellkern translozieren. **Abb.50** zeigt eine immunohistochemische Färbung von IL-1 $\beta$ - bzw. TNF $\alpha$ -behandelten Hep3B. In der oberen Bildreihe ist deutlich die Translokation des diffus im Zytosol verteilten p50 in den Zellkern zu erkennen. Die p65-Translokation nach IL-1 $\beta$ - bzw. TNF $\alpha$ -Behandlung ist in der unteren Bildreihe wiedergegeben.



**Abb.50 Immunohistochemische Detektion von p50/NF $\kappa$ B1 und p65/RelA in Hep3B-Zellen.** IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -Behandlung induzieren in Hep3B eine Translokation der NF $\kappa$ B-Untereinheiten p50/NF $\kappa$ B1 und p65/RelA aus dem Zytosol in den Zellkern.

### 3.5.3.3.2 Mechanismen der IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -induzierten IL-8-Expression

Das Chemokin Interleukin-8 (IL-8) gilt als klassisches NF $\kappa$ B-Zielgen. Die IL-8-Expression in PHH und Hep3B wurde nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  mittels qRT-PCR quantifiziert. In beiden Zelltypen führte sowohl IL-1 $\beta$  als auch TNF $\alpha$  zu einer signifikant erhöhten IL-8-Expression verglichen mit unbehandelten Zellen (**Abb.51**), wobei der Faktor der Induktion in Hep3B deutlich höher ausfiel als in PHH.



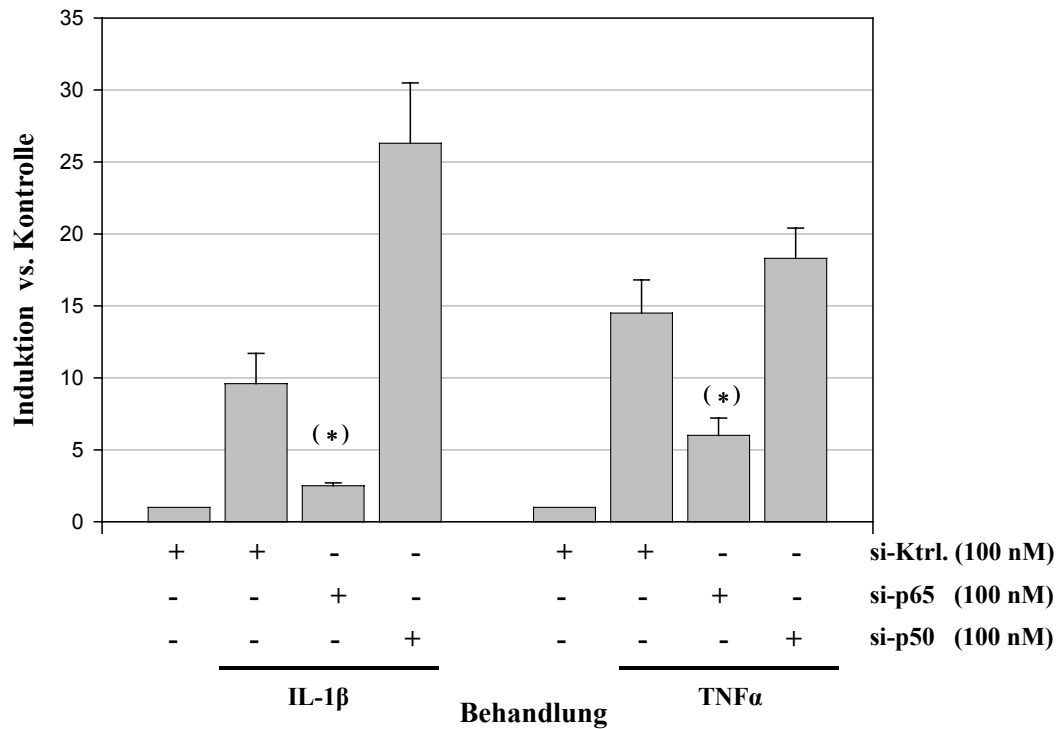
**Abb.51 qRT-PCR: IL-8-Expression in primären humanen Hepatozyten und Hep3B- Zellen.** Sowohl IL-1 $\beta$  als auch TNF $\alpha$  induzieren in PHH und Hep3B die Expression von IL-8.

### 3.5.3.3.3 Transfektion von Hep3B-Zellen mit gegen p50/NF $\kappa$ B1 und p65/RelA

#### gerichteten siRNA-Oligonukleotiden

Wurden Hep3B-Zellen 48 Stunden vor Beginn der IL-1 $\beta$ - bzw. TNF $\alpha$ -Behandlung mit siRNA gegen p65/RelA transfiziert, konnte eine ca. 50 %ige Inhibition der zytokininduzierten IL-8-Expression beobachtet werden (**Abb.52**). Die Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden gegen p50/NF $\kappa$ B1 zeigte keinen inhibitorischen Effekt, sondern verstärkte geringfügig die IL-8-Transkription nach IL-1 $\beta$ - bzw. TNF $\alpha$ -Behandlung. Diese Beobachtung kann mit dem Fehlen einer Transaktivierungsdomäne im p50-Molekül begründet werden, was zur Folge hat, daß isoliert vorliegendes p50 transkriptionell inaktiv ist. p50/NF $\kappa$ B1 konkurriert mit

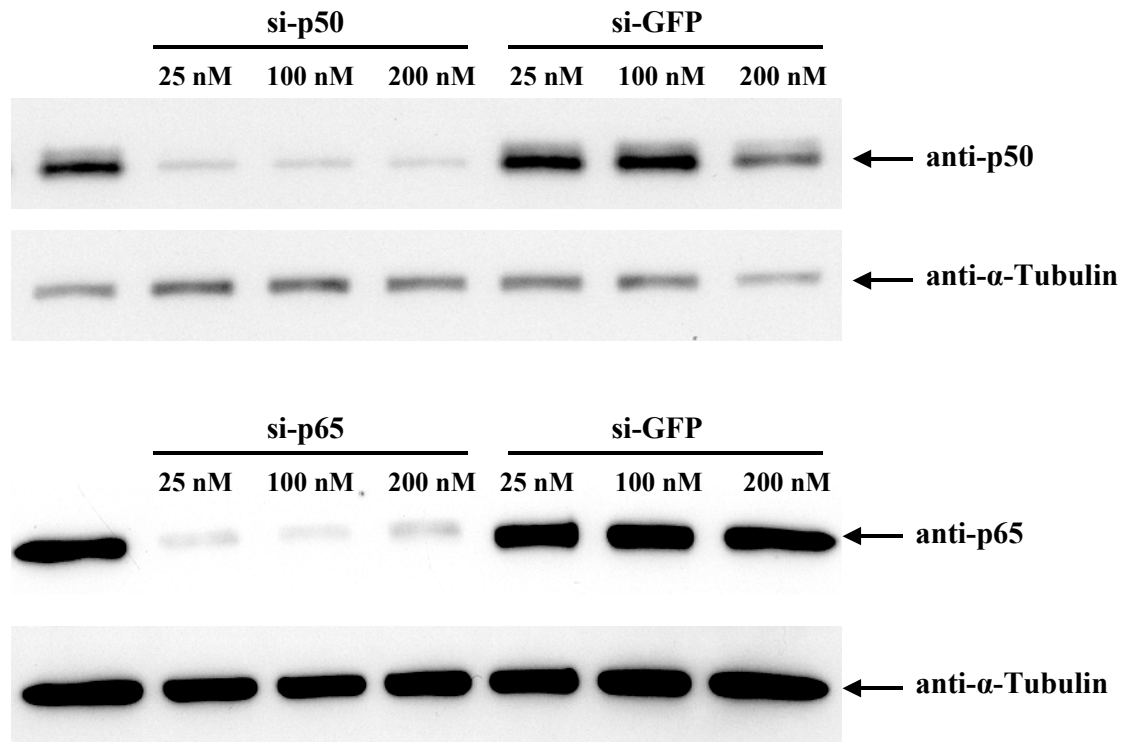
p65/RelA um die NF $\kappa$ B-Bindungsstellen im Promoter und verdrängt die transkriptionell aktive Isoform, wodurch inhibitorische Effekte vermittelt werden (Schmitz *et al.*,1991).



**Abb.52 qRT-PCR: IL-8-Expression in Hep3B-Zellen.**

Transfektion von si-p65/RelA inhibierte die IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -induzieren IL-8-Expression in Hep3B. Durch si-p50/NF $\kappa$ B wird die Zytokin-ausgelöste IL-8-Expression verstärkt. (\*) = signifikante Hemmung ( $p < 0,05$ ).

Die verlässliche Inhibition der p50/NF $\kappa$ B1 und p65/RelA-Expression wurde durch Western-Blot-Analyse überprüft. Die Ergebnisse dieser Kontrolle sind in **Abbildung 53** gezeigt.



**Abb.53 Western-Blot-Analyse: p50- und p65-Detektion in Hep3B-Zellen.**

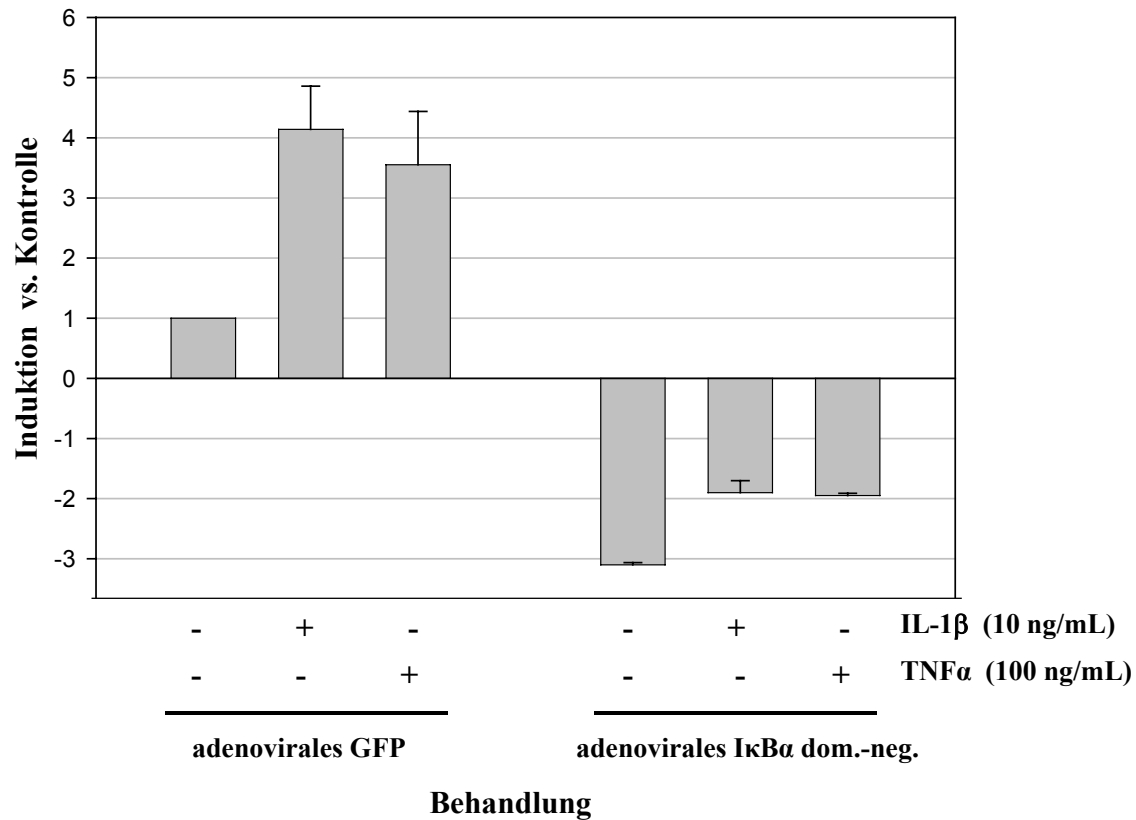
Oben: Verschiedene Konzentrationen von si-p50 bzw. si-GFP wurden transfiziert. Unten: Verschiedene Konzentrationen von si-p65 bzw. si-GFP wurden transfiziert. Die Detektion von  $\alpha$ -Tubulin diente als Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge. Lysate von unbehandelten Zellen spiegeln die basale Proteinexpression wider (erste Bande von links).

#### 3.5.3.3.4 Adenoviraler Gentransfer einer dominant-negativen Variante des I $\kappa$ B $\alpha$ -

##### Proteins in Hep3B-Zellen

Zur weiteren Untermauerung der Hypothese, dass IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in gleichem Maße NF $\kappa$ B aktivieren, wurde in Hep3B-Zellen mittels adenoviralem Gentransfer ein die bereits beschriebene dominant-negative Form des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins überexprimiert. Als Kontroll-Protein diente adenoviral transferiertes GFP. Die infizierten Zellen wurden 48 Stunden nach Infektion für 24 weitere Stunden mit IL-1 $\beta$  bzw. TNF $\alpha$  behandelt und die IL-8-mRNA-Expression in GFP- bzw. I $\kappa$ B $\alpha$ -dominant negativ-transgenen Zellpopulationen verglichen (**Abb.54**). Die Inhibition der NF $\kappa$ B-Signaltransduktion durch Überexpression des dominant-negativen I $\kappa$ B $\alpha$

fürte zur vollständigen Blockade der IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -induzierten IL-8-Expression und senkte die IL-8-mRNA Spiegel deutlich unter die basale Expressionsebene unbehandelter GFP-transgener Zellen.

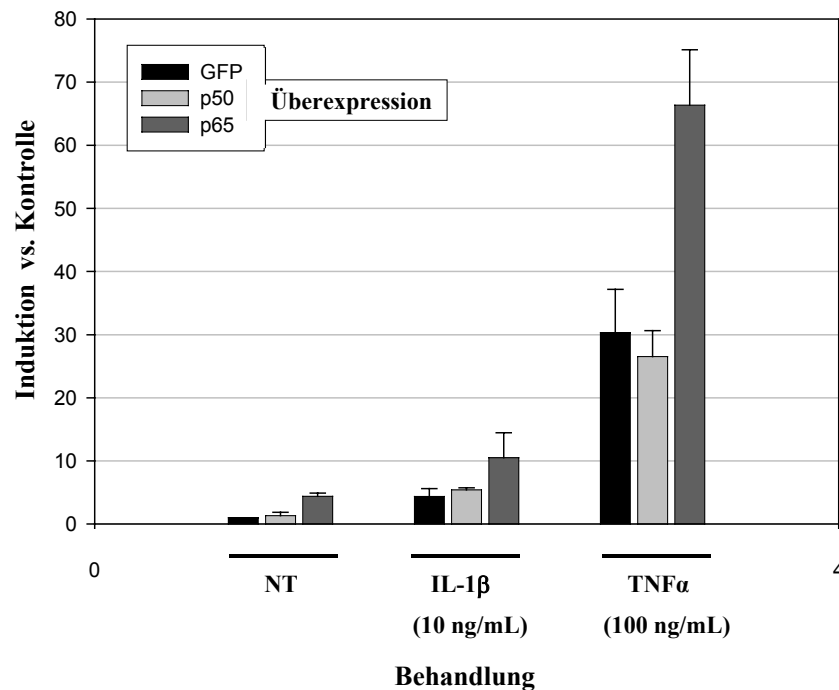


**Abb.54 qRT-PCR: IL-8-Expression in Hep3B-Zellen nach Überexpression dominant-negativen IκBα-Proteins.**

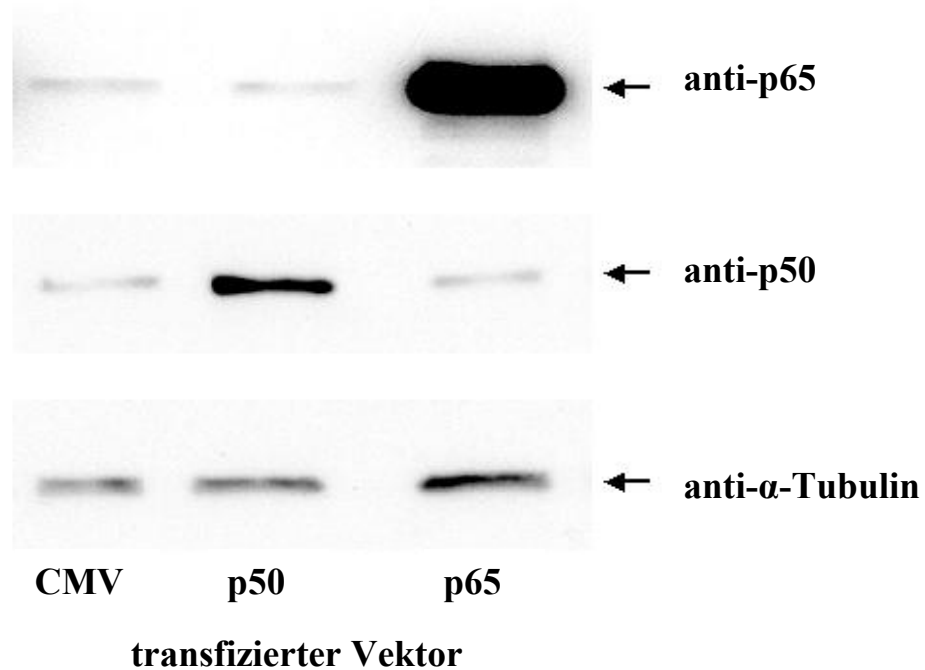
Die IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -induzieren IL-8-Expression wird durch dominant-negatives IκBα bis unter die basale Expressionsebene gesenkt.

### 3.5.3.3.5 Überexpression von p50/NFκB1 und p65/RelA in Hep3B-Zellen

Die Überexpression der NFκB-Untereinheiten p65/RelA und p50/NFκB1 in Hep3B spiegelt im bezug auf die Rolle von NFκB in der IL-1β- und TNFα-induzierten Signaltransduktion die Ergebnisse der siRNA-Experimente wieder. Die Überexpression von p65/RelA induziert eine vermehrte IL-8-Transkription in unbehandelten GFP-kontrolltransfizierten Hep3B und verstärkt deutlich die IL-1β- und TNFα-induzierte IL-8 Synthese (**Abb.55**). Überexprimiertes p50/NFκB1 verhält sich neutral in bezug auf die basale und induzierte IL-8-Expression. Die p50- und p65-Proteinexpression nach Transfektion mit den entsprechenden Plasmiden wurde durch Western-Blot-Analyse überprüft (**Abb.56**).



**Abb.55 qRT-PCR: Basale und Zytokin-induzierte IL-8-Expression in Hep3B-Zellen nach p50- und p65-Überexpression.**

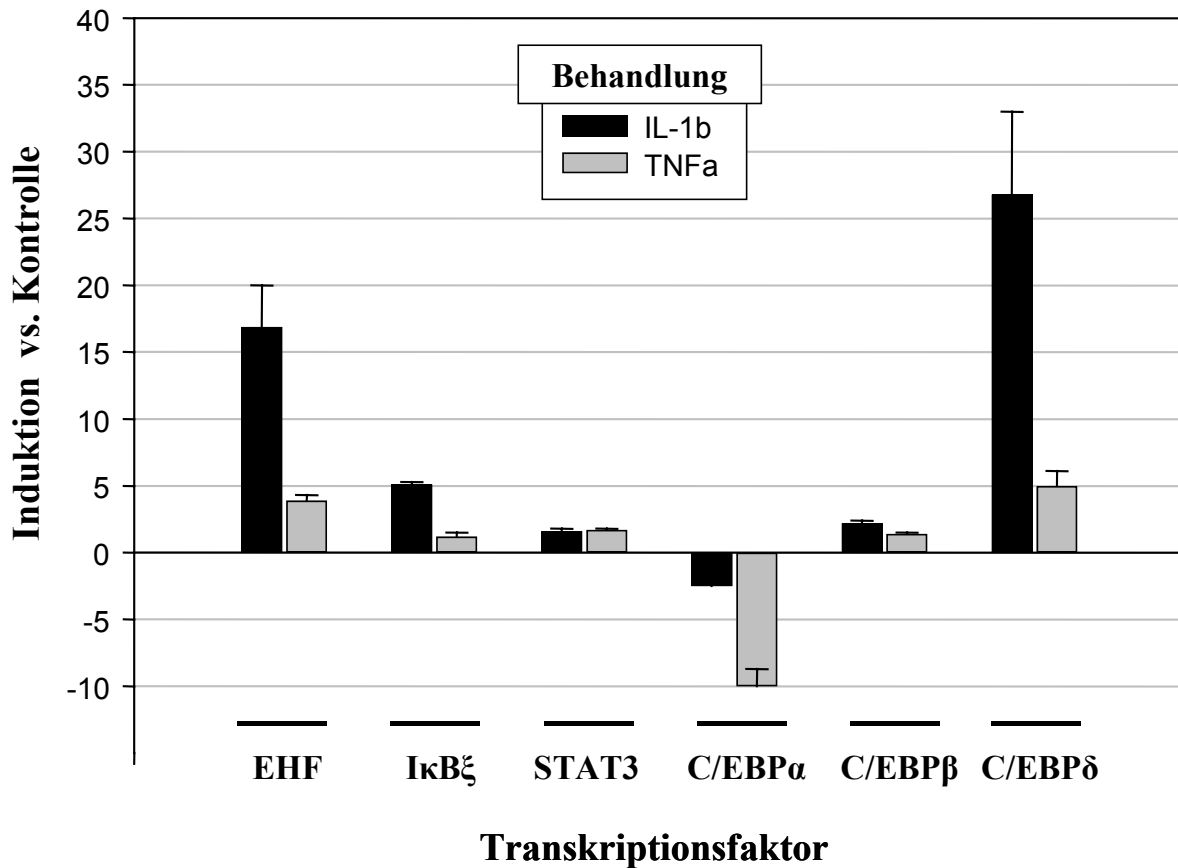


**Abb.56 Western-Blot-Analyse: p50- und p65-Detektion in Hep3B-Zellen.**  
p50-, p65- und CMV-Leervektor wurden liposomal in Hep3B-Zellen transfiziert.

### 3.5.3.4 Unterschiede der IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -induzierten Genexpression

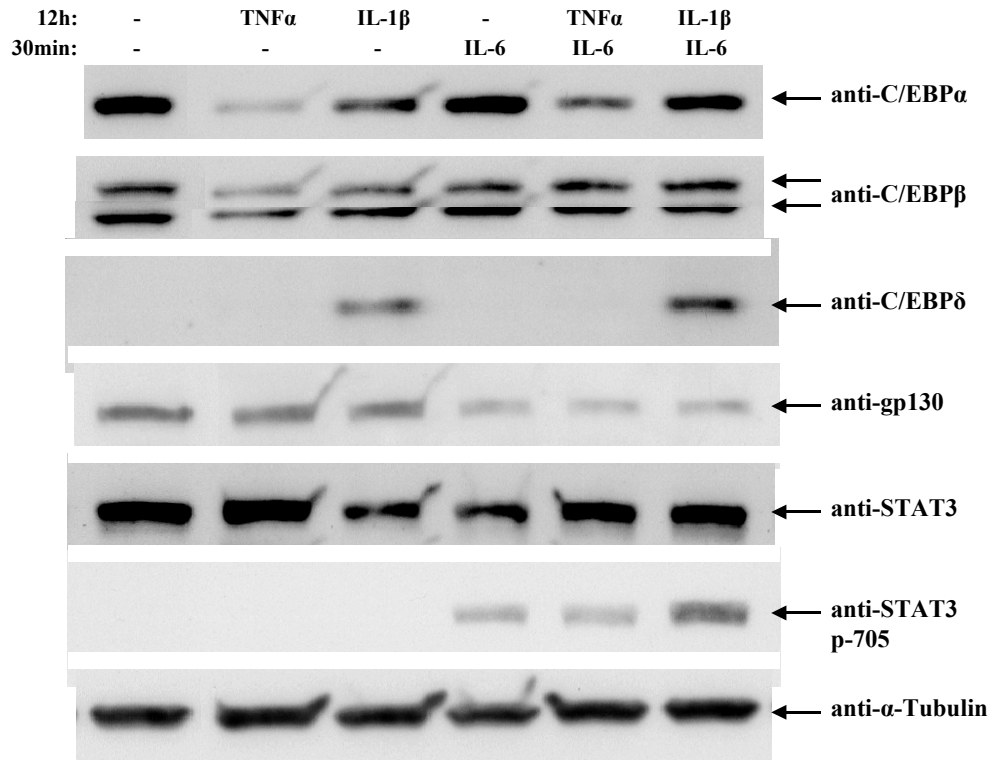
Neben einer Reihe von APPs, deren Expression in Hepatozyten in gleichem Maße von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  angeregt wird, hat die globale Genexpressionsanalyse in Hep3B-Zellen nach Zytokin-Behandlung Cluster von Genen offenbart, deren Transkription praktisch ausschließlich durch IL-1 $\beta$  induzierbar war. Als Beispiele sind hier die Transkriptionsfaktoren Ets-homologer Faktor (EHF), NF $\kappa$ B-Inhibitor zeta (I $\kappa$ B $\xi$ ), C/EBP $\delta$  und das Plasmaprotein Lipocalin2 (LCN2) zu nennen. Mittels qRT-PCR wurde die Expression der genannten Transkriptionsfaktoren und die Expression von STAT3, C/EBP $\alpha$  und C/EBP $\beta$  in Hep3B-Zellen nach 24-stündiger IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -Behandlung miteinander verglichen (**Abb.57**). Interessanterweise bewirken beide Zytokine eine deutlich verminderte C/EBP $\alpha$ -mRNA-Expression, die im Falle der TNF $\alpha$ -Behandlung stärker ausgeprägt ist. Die EHF-, I $\kappa$ B $\xi$ - und C/EBP $\delta$ -Expression wurde entweder ausschließlich durch IL-1 $\beta$  induziert (I $\kappa$ B $\xi$ , C/EBP $\beta$ ), bzw. IL-1 $\beta$  löste ein deutlich stärkere mRNA-Expression der entsprechenden Faktoren aus (EHF, C/EBP $\delta$ ). Die STAT3-Expression blieb von der IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -Behandlung unbeeinflusst.



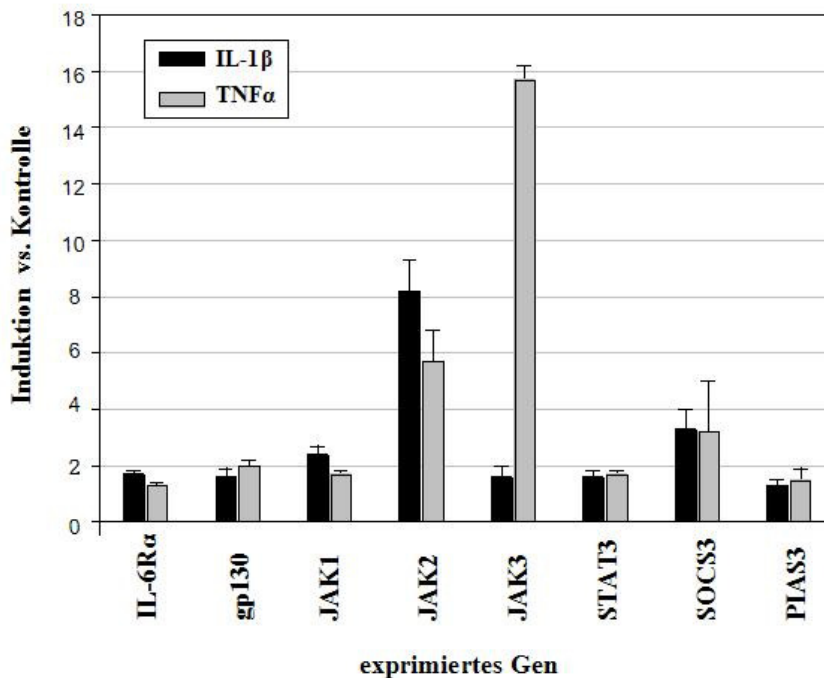


**Abb.57 qRT-PCR:** Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren in Hep3B-Zellen nach IL-1 $\beta$ - bzw. TNF $\alpha$ -Behandlung.

Wie bereits zu Anfang des **Kapitels 3.5.3.1** erwähnt wurde, wirkte sich die Behandlung von Hep3B-Zellen mit einer Kombination aus IL-1 $\beta$  und IL-6 synergistisch auf die Expression der CRP-mRNA aus, während TNF $\alpha$  in Kombination mit IL-6 einen starken inhibitorischen Effekt auf die IL-6-induzierte CRP-Expression ausübte (**Abb.21**). Neben den bereits erwähnte Transkriptionsfaktoren, deren vermehrte Expression durch IL-1 $\beta$ -Behandlung induziert wurde, kommt eine durch IL-1 $\beta$ - oder TNF $\alpha$ -Stimulation ausgelöste veränderte Genexpression verschiedener Komponenten des IL-6-Signaltransduktionsweges als Erklärung für die gegenläufigen Effekte von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in Frage. Um diese These genauer zu überprüfen, wurden Hep3B-Zellen mit IL-1 $\beta$  bzw. TNF $\alpha$  für 12 Stunden vorbehandelt und nach Mediumwechsel für 30 Minuten mit IL-6 stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde durch Western-Blot-Analyse die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren und die Expression bzw. Aktivierung verschiedener Komponenten des IL-6-Signaltransduktionsweges untersucht (**Abb.58**). Zusätzlich wurde durch qRT-PCR die Transkription der inhibitorischen Proteine SOCS3 und PIAS3 und deren übergeordneter Signalproteine nach IL-1 $\beta$ - bzw. TNF $\alpha$ -Behandlung analysiert (**Abb.59**).

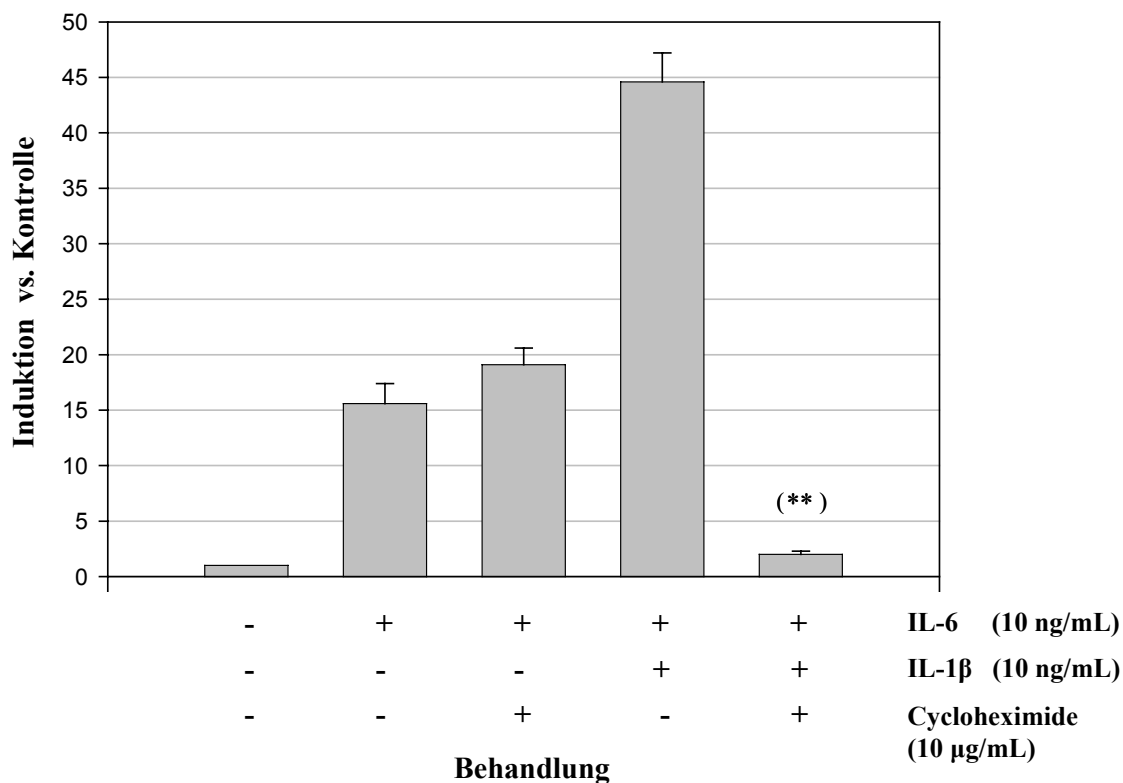


**Abb.58 Western-Blot-Analyse:** Expression verschiedener Komponenten der IL-6-Signaltransduktion in Hep3B-Zellen nach sequentieller Behandlung mit IL-1 $\beta$  bzw. TNF $\alpha$  und IL-6.



**Abb.59 qRT-PCR:** Expression verschiedener Komponenten der IL-6-Signaltransduktion in Hep3B-Zellen nach IL-1 $\beta$ - bzw. TNF $\alpha$ -Behandlung.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß C/EBP $\alpha$  eine wichtige Rolle bei der IL-6-induzierten Expression von APPs, wie CRP und HP spielt ( **Kap. 3.5.3.2** ). Wenn sowohl IL-1 $\beta$  als auch TNF $\alpha$  die Herunterregulation des für die IL-6-Signaltransduktion bedeutsamen Transkriptionsfaktors C/EBP $\alpha$  bewirken, aber ausschließlich TNF $\alpha$  die IL-6-induzierte CRP-Expression zu inhibieren vermag, dann scheint IL-1 $\beta$  Faktoren zu aktivieren, die den induzierten C/EBP $\alpha$ -Mangel kompensieren und die CRP-Expression synergistisch verstärken. Als verantwortlicher Mechanismus wäre hier die IL-1 $\beta$ -induzierte Neusynthese von Transkriptionsfaktoren vorstellbar. Um diese These zu überprüfen wurden Hep3B-Zellen mit einer Kombination aus IL-1 $\beta$  und IL-6 bzw. mit diesem Zytokingemisch in Gegenwart des Proteinbiosynthese-Inhibitors Cycloheximide für 6 Stunden inkubiert. Die CRP-mRNA-Expression dieser Zellen wurde mit der von IL-6 + Cycloheximide bzw. rein IL-6-behandelten Zellen verglichen. Die Proteinbiosynthese-Inhibition hatte keinen Effekt auf die IL-6 induzierte CRP-Transkription, während die durch das Zytokingemisch ausgelöste CRP-mRNA-Synthese vollständig blockiert wurde (**Abb.60**).

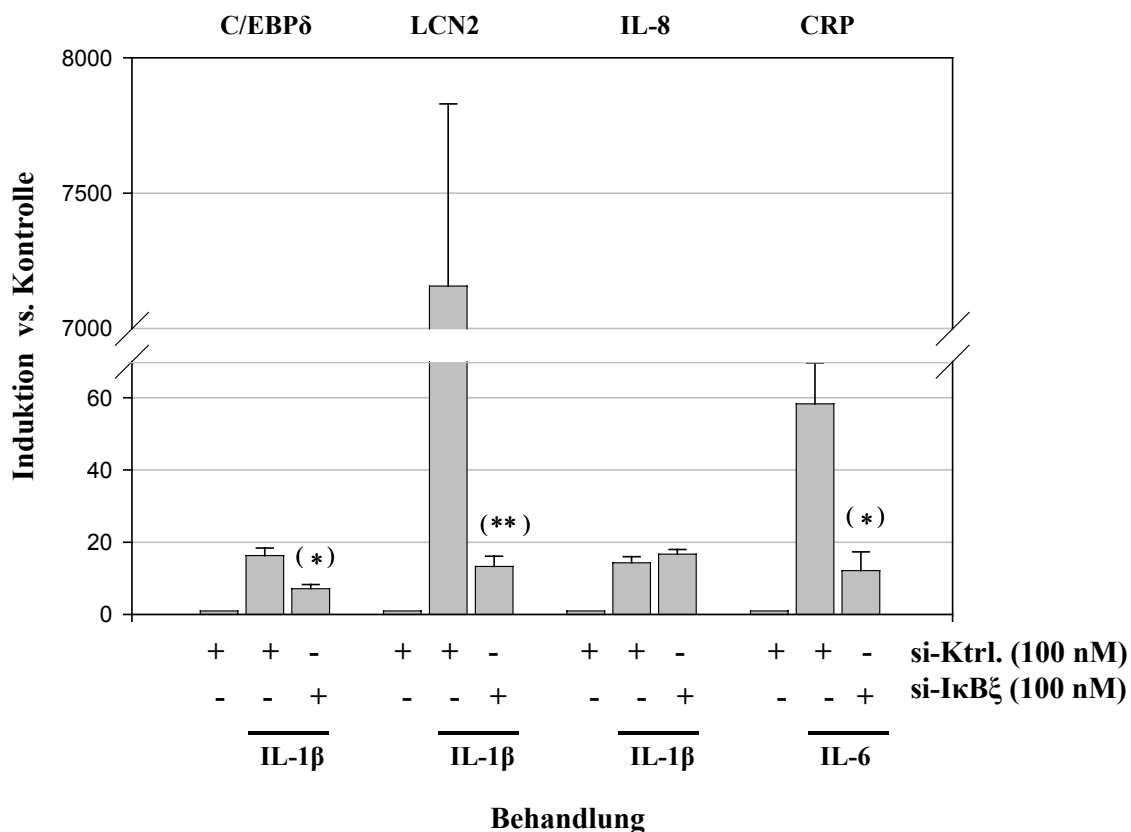


**Abb.60 qRT-PCR: CRP-Expression in Hep3B.**

Eine Behandlung mit dem Proteinbiosynthese-Inhibitor Cycloheximide hat keinen Einfluß auf die IL-6-induzierte CRP-Expression, blockt hingegen vollständig die durch das Zytokingemisch ausgelöste CRP-Transkription. \*\* = hochsignifikante Hemmung ( $p < 0,001$ );

### 3.5.3.5 Inhibition der I $\kappa$ B $\xi$ -Expression in Hep3B-Zellen durch siRNA

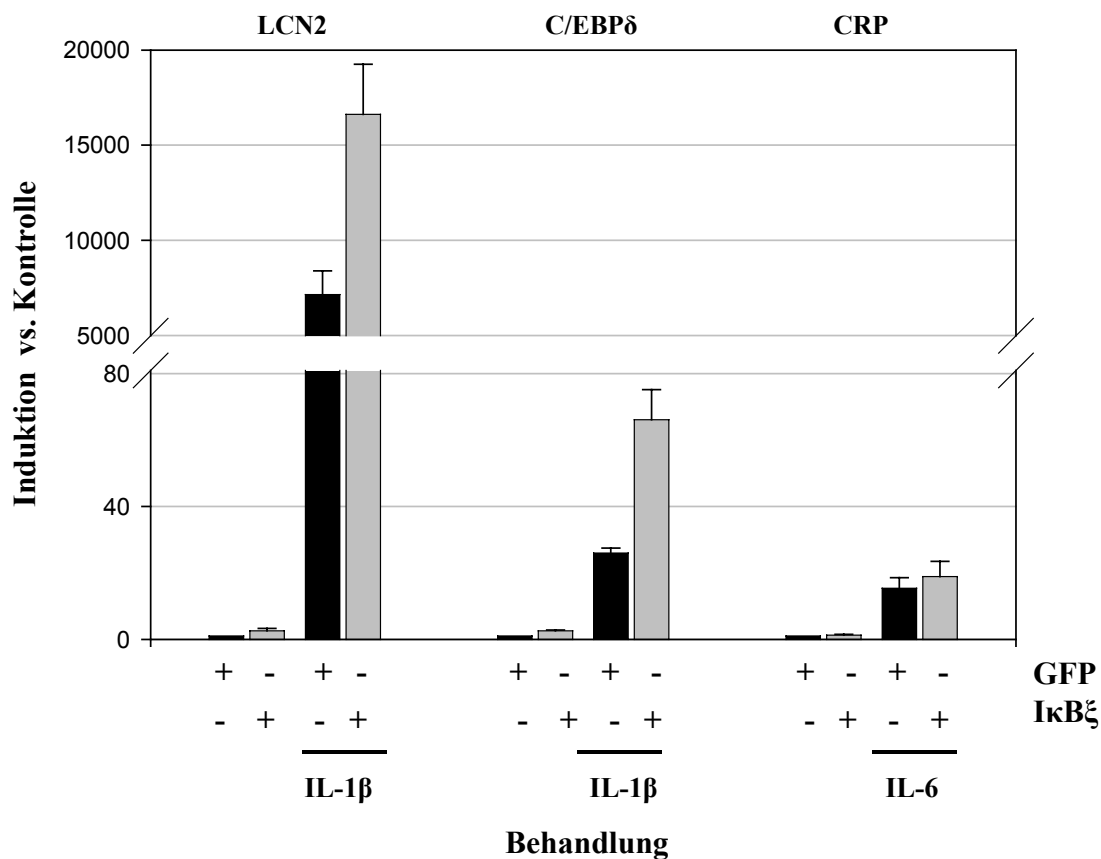
Durch gezielte Expressionshemmung von I $\kappa$ B $\xi$  mittels siRNA-Technologie sollte die Rolle dieses Transkriptionsfaktors in der IL-1 $\beta$ - und IL-6-induzierten Transkription beurteilt werden. Hep3B-Zellen wurden liposomal mit 100 nM si-I $\kappa$ B $\xi$ -Oligonukleotiden transfiziert und nach 24 Stunden für weitere 12 Stunden mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  oder IL-6 behandelt. Nach Isolation der Gesamt-RNA wurde die relative C/EBP $\delta$ -, LCN2-, IL-8- und CRP-Expression durch qRT-PCR ermittelt (**Abb.61**). Das IL-1 $\beta$ -induzierte Transkription des NF $\kappa$ B-Zielgens IL-8 wurde durch die Hemmung der I $\kappa$ B $\xi$ -Synthese nicht beeinflusst, wohingegen die IL-1 $\beta$ -ausgelöste C/EBP $\delta$ -Expression signifikant und die LCN2-Expression hochsignifikant gehemmt wurde. Ebenso bewirkte die Transfektion der Hep3B-Zellen mit si-I $\kappa$ B $\xi$ -Oligonukleotiden, daß die IL-6-induzierte CRP-Transkription signifikant reduziert wurde.



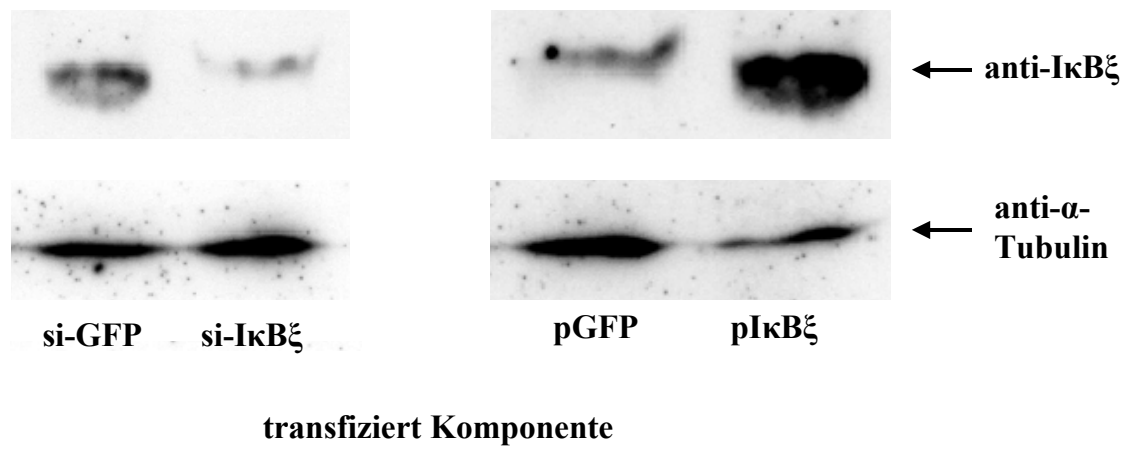
**Abb.61 qRT-PCR: Effekte der Transfektion von Hep3B-Zellen mit si-I $\kappa$ B $\xi$ -Oligonukleotiden auf die Zytokin-induzierte Expression verschiedener Gene. (\*) = signifikante Hemmung ( $p < 0,05$ ); (\*\*) = hochsignifikante Hemmung ( $p < 0,001$ );**

### 3.5.3.6 $\text{I}\kappa\text{B}\xi$ -Überexpression in Hep3B-Zellen

Die Überexpression des  $\text{I}\kappa\text{B}\xi$ -Proteins in Hep3B-Zellen sollte weiteren Aufschluß über eine mögliche Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an der Expression ausgewählter Akute Phase Proteine geben. Hep3B-Zellen wurden liposomal mit einem  $\text{I}\kappa\text{B}\xi$ -Expressionsplasmid transfiziert und 24 Stunden später für weitere zwölf Stunden mit IL-1 $\beta$  bzw. IL-6 stimuliert. Die basale Expression von LCN2, C/EBP $\delta$  und CRP der  $\text{I}\kappa\text{B}\xi$ -überexprimierenden Zellen wurde mit der GFP-kontrolltransfizierter verglichen und war für LCN2 2,5-fach  $\pm$  0,3 sowie für C/EBP $\delta$  2,6-fach  $\pm$  0,2 verstärkt (**Abb.62**). Die basale CRP-Transkription wurde durch  $\text{I}\kappa\text{B}\xi$ -Überexpression nicht beeinflusst (1,3-fach  $\pm$  0,3). Auf die IL-1 $\beta$ -Stimulation reagierten die  $\text{I}\kappa\text{B}\xi$ -transfizierten Zellen mit einer im Vergleich zu GFP-transfizierten Zellen 2-2,5-fach verstärkten LCN2- bzw. C/EBP $\delta$ -mRNA-Produktion. Die IL-6-ausgelöste CRP-Expression erfuhr keine signifikante Veränderung durch die Überexpression des Transkriptionsfaktors.



**Abb.62 qRT-PCR: Effekte einer Überexpression des Transkriptionsfaktors  $\text{I}\kappa\text{B}\xi$  auf die Transkription ausgesuchter Gene in Hep3B-Zellen.** Sowohl die basale als auch die IL-1 $\beta$ -induzierte Expression von LCN2 (links) und C/EBP $\delta$  (mitte) wird durch  $\text{I}\kappa\text{B}\xi$ -Überexpression verstärkt. Auf die basale und induzierte CRP-Transkription hatte die  $\text{I}\kappa\text{B}\xi$ -Überexpression keinen signifikanten Einfluß (rechts).



**Abb.63 Western-Blot-Analyse:** IκBξ-Expression in Hep3B-Zellen nach Überexpression (rechts) und Hemmung der Proteinsynthese durch spezifische siRNA-Oligonukleotide (links). Die IκBξ-Expression konnte *in vitro* effektiv induziert bzw. gehemmt werden.

### 3.6 *In silico*-Promoter-Analyse

#### 3.6.1 Analyse der Promoter definierter Gengruppen

Durch nähere Betrachtung der 5'-untranslatierten DNA-Sequenzen verschiedener Akute Phase Proteine sollte untersucht werden, ob sich die experimentell ermittelten Expressionscharakteristika dieser Gene in der Struktur ihrer Promoter widerspiegelt. Zu diesem Zweck wurde mit dem MatInspector-Programm der Genomatix Software GmbH (München, Deutschland) in dem Sequenzabschnitt von (-500 bp) bis zum Transkriptionsstart nach potentiellen Erkennungs-Motiven verschiedener Transkriptionsfaktoren (TF) gesucht. Nach derzeitigem Erkenntnisstand geht man davon aus, daß das menschliche Genom die Information für 1850 bis 3000 Transkriptionsfaktoren beinhaltet, von denen bisher ca.1400 eindeutig identifiziert wurden (Venter *et al.*, 2001; Lander *et al.*, 2001). Diese große Anzahl transkriptioneller Aktivatoren und Repressoren macht die Verwendung hochspezialisierter Datenverarbeitungsprogramme nötig, um DNA-Sequenzen auf ihre potentielle Affinität zu Transkriptionsfaktoren zu überprüfen. Neben der MatInspector Software gibt es eine Vielzahl weiterer Programme, die eine Suche nach möglichen TF-Bindungsmotiven ermöglichen (Cartharius *et al.*, 2005). Es muß allerdings immer berücksichtigt werden, daß die Ergebnisse einer derartigen Analyse lediglich die theoretische Wahrscheinlichkeit widerspiegeln, mit der ein TF mit einer bestimmte DNA-Sequenz interagieren kann und keinerlei Aufschluß über die Funktionalität dieser theoretisch möglichen Bindung gibt. Für viele Transkriptionsfaktoren wurden experimentell sogenannte atypische Bindungsmotive identifiziert, die nicht vorhersehbar waren. Desweiteren führen *in vitro* und *in vivo* häufig Multi-TF-Komplexe, von denen nur ein Faktor mit dem Promoter interagiert, zur Formierung des transkriptionellen Apparates.

Die Funktionsweise der MatInspector Software und die Algorithmen, die ihr zugrunde liegen, wurden von Quandt *et al.*, 1995 und Cartharius *et al.*, 2005 beschrieben.

Die 500 bp-Promoter der in **Kapitel 3.5.1.3 Abb.23** definierten Gencluster II-IV wurden auf die Anwesenheit potentieller Transkriptionsfaktor-Bindungs-Motive untersucht. Ferner sollten zur Abschätzung der durchschnittlichen zufälligen Häufigkeit (ZH), mit der Bindungsmotive einer TF-Familie (TF-F) in einer Gruppe von Genen auftreten, in einem weiteren Analyse-Schritt die 500 bp-Promoter von 48 Genen, die bei der globalen Genexpressionsanalyse als unreguliert aufgefallen waren, untersucht werden.

In **Tabelle 8** ist die durchschnittliche Häufigkeit (DH) der potentiellen Bindungsstellen der am stärksten in den untersuchten Sequenzen vertretenen Transkriptionsfaktor-Familien (TF-F) angegeben. Die letzte Spalte der Tabelle zeigt die durchschnittliche Motiv-Häufigkeit im

gleichen Promoter-Abschnitt der Gruppe von Gene, deren Expression durch keine der Zytokin-Behandlungen induzierbar war an (ZH).

**Tab.8 *In silico*-Promoter-Analyse:**

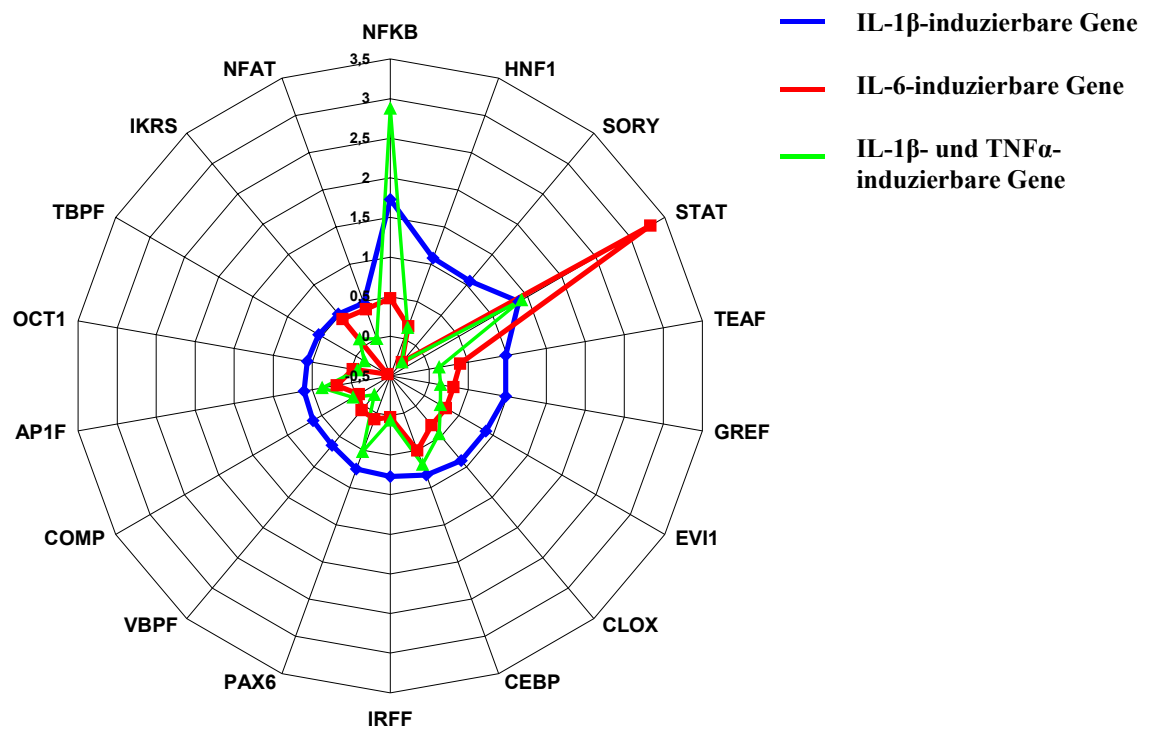
<b>Gen-Cluster</b> <b>TF-F</b>	<b>DH / 500 bp</b> <b>IL-1<math>\beta</math>-</b> <b>induzierbare Gene</b> <b>n= 12</b>	<b>DH / 500 bp</b> <b>IL-6-</b> <b>induzierbare Gene</b> <b>n= 8</b>	<b>DH / 500 bp</b> <b>IL-1<math>\beta</math>- und TNF<math>\alpha</math>-</b> <b>induzierbare Gene</b> <b>n= 15</b>	<b>ZH / 500 bp</b> <b>nicht differentiell</b> <b>exprimierte Gene</b> <b>n= 48</b>
<b>TBPF</b>	2,67	1,67	2,0	2,13
<b>EVII</b>	2,42	1,83	1,75	1,52
<b>NFKB</b>	2,42	1,17	3,56	0,67
<b>SORY</b>	2,33	1,00	1,0	1,27
<b>CLOX</b>	2,25	1,67	1,81	1,35
<b>STAT</b>	2,08	4,00	2,13	0,71
<b>OCT1</b>	2,08	1,5	1,84	1,52
<b>IRFF</b>	2,08	1,33	1,38	1,31
<b>TEAF</b>	1,92	1,33	1,06	0,94
<b>HNF1</b>	1,75	0,83	1,47	0,67
<b>CEBP</b>	1,33	1,0	1,19	0,5
<b>GRAF</b>	1,33	0,67	0,5	0,35
<b>VBPF</b>	1,08	0,5	0,25	0,44
<b>IKRS</b>	0,92	0,83	0,5	0,39
<b>NFAT</b>	0,92	0,83	0,44	0,44
<b>APIF</b>	0,92	0,5	0,69	0,31
<b>COMP</b>	0,83	0,17	0,25	0,21

Die durchschnittliche Häufigkeit (DH) potentieller Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktor-Familien (TF-F) in den 500 bp-Promotern verschiedener nach Zytokin-Behandlung differentiell exprimierter Gene (Cluster II-IV siehe Abb.23) wurde bestimmt. Analog dazu ist die durchschnittliche zufällige Häufigkeit (ZH) der gleichen Bindungsmotive in den Promotern von 48 in der globalen Genexpressionsanalyse als nicht-reguliert aufgefallenen Gene angegeben (detaillierte Beschreibung siehe Text).

Ferner sollte für jeden Gencluster eine Abschätzung vorgenommen werden, ob sich die durchschnittliche Häufigkeit des Auftretens eines Bindungsmotives im Rahmen der zufälligen



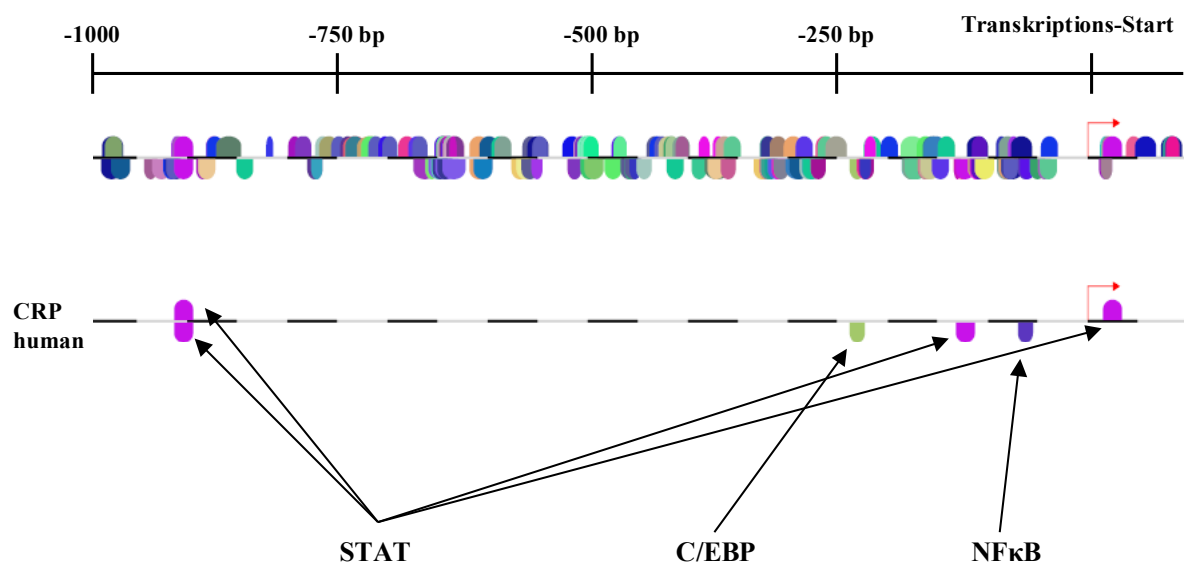
Häufigkeit bewegt, oder deutlich erhöht ist. Zu diesem Zweck wurde die Differenz aus durchschnittlicher Häufigkeit (DH) und zufälliger durchschnittlicher Häufigkeit (ZH) gebildet. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind als normalisierte durchschnittliche Häufigkeit in **Abb.64** dargestellt. Je stärker die Bindungsmotive einer Transkriptionsfaktor-Familie in den Promotern eines Genclusters vertreten sind, umso mehr kann davon ausgegangen werden, daß diese Häufung nicht zufälliger Natur ist, sondern auf eine Beteiligung dieser Transkriptionsfaktor-Familie an der Expression dieser Gene hindeuten. Die Aussagekraft der *in silico*-Promoter-Analyse wird z.B. durch experimentelle Befunde gestärkt, die belegen, daß die Familie der „Signal Transducer and Activator of Transcription“ maßgeblich zur Expression IL-6-abhängiger Gene beitragen (siehe **Kap. 3.5.3.2** und Klein *et al.*, 2005).



**Abb.64 *In silico*-Promoter-Analyse:** Normalisierte durchschnittliche Häufigkeit, mit der potentielle Bindungsmotive verschiedener Transkriptionsfaktor-Familien in drei Gruppen Zytokin-induzierbarer Gene auftreten.

### 3.6.2 Analyse des CRP-Promoters

Der Promoter des humanen CRP-Genes wurde im Bereich von (-1000 bp) bis (+100 bp) auf die Anwesenheit potentieller Transkriptionsfaktor-Familien-Bindungs-Motive untersucht. Unter Ausschluß sogenannter atypischer Bindungsstellen detektiert die MatInspector-Software perfekte Bindungs-Motive von 84 Transkriptionsfaktor-Familien (**Abb.65**). Im unteren Teil der **Abbildung 65** ist die Lage der potentiellen Bindungsmotive der STAT-, C/EBP- und NFκB-Familie innerhalb der CRP-Promoter-Sequenz gezeigt.



**Abb.65 In silico-Promoter-Analyse: Detektion potentieller Erkennungsmotive verschiedener Transkriptionsfaktor-Familien im (-1000/+100 bp)-Promoter des humanen CRP-Genes.**  
 Oben: Die Lage der Bindungsmotive aller bisher bekannten Transkriptionsfaktor-Familien ist in Form farbiger Punkte dargestellt.  
 Unten: Die Lage der Bindungsstellen ausgesuchter Transkriptionsfaktor-Familien innerhalb der Promoter-Sequenz wird angezeigt.

human

Die Beteiligung der Transkriptionsfaktoren STAT3 und der C/EBP-Isoformen alpha, beta und delta an der transkriptionellen Regulation der CRP-Expression wurde in dieser Arbeit experimentell bewiesen, so daß das Vorhandensein der entsprechenden Bindungs-Motive in den Promotern dieses Gens mit den experimentellen Befunden der *in vitro*-Analysen in Einklang stehen. Überraschend erscheint allerdings, daß im zellulären Experiment eine NFκB-Aktivierung durch IL-1β oder TNFα allein nicht ausreichend war, eine verstärkte CRP-Transkription auszulösen, obwohl sich im Promoter dieses Gens in der Nähe des transkriptionellen Starts ein optimales Erkennungsmotiv für Mitglieder der NFκB –Familie befindet.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Zelluläre Modelle zur Untersuchung regulatorischer Mechanismen der Akuten**

#### **Phase Reaktion**

Neben einer wichtigen Rolle in der Immunabwehr des Organismus gibt es klare Hinweise darauf, daß das C-reaktive Protein ein kardiovaskulärer Risikofaktor mit direkten proatherogenen Eigenschaften ist. Auch wenn die Entdeckung des C-reaktiven Proteins bereits viele Jahre zurückliegt und in der darauf folgenden Zeit weitreichende Erkenntnisse über die Rolle dieses Akute Phase Proteins gewonnen wurden, ist bis zum heutigen Tage nicht eindeutig geklärt, welche Signaltransduktionskaskaden im einzelnen für eine vermehrte CRP-Expression verantwortlich sind. Die verschiedensten Zytokine und biologischen Signalmediatoren sind als Induktoren der CRP-Synthese beschrieben worden und mit ihnen die potentiell nachgeschalteten Signaltransduktionewege. Als wichtigste Elemente sind hier die NFκB-Signaltransduktion nach Aktivierung durch Lipopolysaccharid, Tumor Nekrose-Faktor alpha- und Interleukin-1 beta sowie der JAK/STAT-Signalweg nach Aktivierung durch Interleukin-6 zu nennen. Nach der einige Jahre lang kontrovers geführten Diskussion, ob CRP auch in den Geweben von Pankreas und Niere bzw. den Geweben der Gefäßwandung exprimiert wird, scheint mittlerweile allgemein akzeptiert zu sein, daß die Hepatozyten der Leber als Hauptsyntheseort anzusehen sind. Jegliche in geringem Maße in anderen Geweben detektierbare CRP-Expression mag gewisse lokale Konsequenzen haben, spielt aber für die Ausprägung erhöhter CRP-Plasmaspiegel im Rahmen einer Akute Phase Reaktion nur eine untergeordnete Rolle.

Die zum Teil sehr widersprüchlichen experimentellen Befunde darüber, welche Faktoren als Auslöser der CRP-Synthese in Frage kommen, mag auch auf den Mangel an geeigneten Testmodellen zurückzuführen zu sein. Primäre humane Hepatozyten stellen das vermeintlich natürlichste System dar, da dieser Zelltyp auch *in vivo* das relevante biologische Umfeld für die CRP-Genexpression repräsentiert. Als eines der größten Probleme dieses Testsystems ist allerdings die geringe Verfügbarkeit dieser Zellen anzusehen. Zwar sind primäre humane Hepatozyten mittlerweile bei verschiedenen Anbietern kommerziell erhältlich, doch liegen die finanziellen Aufwendungen, die für den Bezug dieser Zellen nötig sind, in einem Bereich, daß die routinemäßige Verwendung von PHH für wissenschaftliche Arbeiten praktisch nicht möglich ist und auf einzelne Experimente beschränkt bleiben muß. Desweiteren ist bei der Verwendung primärer humaner Hepatozyten zu berücksichtigen, daß diese Zellen als Resultat einer Leberteileresektion bei einem tumor erkrankten Patienten verfügbar werden. Neben

natürlich auftretenden interindividuellen Schwankungen im Bereich der allgemeinen Genexpression, (man bedenke z.B., wie stark bei einzelnen Personen die Bildung und Aktivität der Cytochrome variieren kann), erschwert die Tatsache, daß hospitalisierte häufig multimorbide Patienten einer intensiven Pharmakotherapie ausgesetzt sind, die gerade in den Geweben der Leber umfangreiche Veränderungen der Genexpression induzieren kann. Aus diesen Gründen sind PHH nicht von vorne herein als ideales Modell zur Entschlüsselung von Signaltransduktionskaskaden geeignet. Im Gegenteil, in der Praxis hat sich gezeigt, daß die Genexpressionsprofile der PHH von zehn verschiedenen Donoren keine verallgemeinerbare Aussagen über regulatorische Mechanismen zuließen. Deshalb stellte sich auch zu Beginn dieser Arbeit die Frage nach einem geeigneten zellulären Testmodell, das jederzeit in größeren Mengen kostengünstig zur Verfügung steht. Bei der Überprüfung der leicht zu kultivierenden Hepatoma-Zelllinie HepG2 konnte weder auf mRNA- noch auf Protein-Ebene eine CRP-Expression als Folge einer Zytokinbehandlung nachgewiesen werden, woraufhin diese Zelllinie stabil mit einem humanen CRP-Promoter-Luciferase-Konstrukt transfiziert wurde. Hierdurch wurde ein den ökonomischen und praktischen Anforderungen entsprechendes Testsystem generiert, das sowohl bei der Entschlüsselung von Signaltransduktionskaskaden in Hepatozyten eingesetzt werden kann als auch bei der Identifizierung bzw. Entwicklung von pharmakologisch aktiven Substanzen, die die CRP-Expression modulieren oder inhibieren, von großem Nutzen wäre. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die Hepatomazelllinie Hep3B als Modell zur Untersuchung regulatorischer Mechanismen der Akuten Phase Reaktion etabliert und charakterisiert. Auch wenn die von dieser Zelllinie nach Zytokin-Behandlung sezernierten Mengen CRP-Proteins so gering ausfielen, daß zu deren Bestimmung eine ca. 5-fache Aufkonzentration der Proteinfraction nötig war, und diese Meßgröße damit nicht in Frage kam, so konnte in diesen Zellen auf mRNA-Ebene die differentielle Expression von CRP und einer Reihe weiterer Akute Phase Proteine detektiert werden.

#### **4.2 Globale Genexpressionsanalyse in Zytokin-aktivierten Hep3B-Zellen**

Die globale Genexpressionsanalyse durch cDNA-Microarrays bietet die Möglichkeit, in einem verhältnismäßig wenig zeitaufwendigen Verfahren die differentielle Expression vieler tausender Gene bzw. des gesamten Genoms zu überprüfen, und war damit für eine erste Charakterisierung der Hep3B-Zelllinie als Model der Akuten Phase Reaktion das Mittel der Wahl. Anhand der durch diese Methode generierten Datensätze konnte unter Zuhilfenahme unterschiedlichster statistischer Analyseverfahren ein erster Eindruck über die

transkriptionelle Aktivität dieser Zelllinie gewonnen werden. Die Behandlung von Hep3B-Zellen mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 sollten das klassische Milieu nachstellen, das im Rahmen einer Akuten Phase Reaktion im Organismus zur Expression von APP wie z.B. CRP führt.

Die nach der Isolierung und Modifizierung des Probenmaterials sowie der Durchführung von Chiphybridisierung und Chip-Scan erhaltenen Rohdaten bestanden die Qualitätskontrolle und wurden im folgenden zur Errechnung relativer Expressionwerte herangezogen. Jeder Datensatz lag in Duplikaten vor, da je Zytokin-Behandlung zwei Proben vorbereitet worden waren. Auf den HG-U133 Plus 2 Chips der Firma Affymetrix sind ca. 55 000 cDNA-Oligonukleotid-Sequenzen aufgetragen, so daß pro analysierter Probe die gleiche Anzahl an Intensitätsdatenpunkten zu bearbeiten war. Die speziell für derartige Zwecke programmierte Rosetta-Resolver-Software 5.0 der Firma Inpharmatics LLC Biosoftware (Seattle, USA) ermöglicht eine schnelle und unproblematische Bearbeitung derartig großer Datensätze. Beim Vergleich der Intensität eines jeden Meßpunktes, der aus dem Probenmaterial Zytokin-stimulierter Zellen hervorging, mit dem gleichen Meßpunkt einer unbehandelten Probe ergibt sich eine Ratio, die in Abhängigkeit davon, ob sie größer oder kleiner als 1 ist, die relative Expression eines einzelnen Gens nach Zytokin-Behandlung ausdrückt. Beim Auftragen der relativen Expression aller Gene gegen ihre Fluoreszenzintensität in Form eines Dot-Plots (siehe **Abb.20**) fiel zunächst auf, daß die Verteilung der Datenpunkte innerhalb der Plots von IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -stimulierten Proben eine große Ähnlichkeit aufwiesen, während das Verteilungsprofil der durch IL-6-Behandlung differentiell exprimierten Gene stark hiervon abwich. Bei näherer Betrachtung der Datensätze zeigte sich, daß die IL-6-Behandlung mit einer Anzahl von ca. 1500 differentiell exprimierten Genen rund halb so viele Faktoren beeinflusst wie die Stimulation mit IL-1 $\beta$ - oder TNF $\alpha$  (siehe **Tab.5**).

Durch sogenanntes hierarchisches „2D-Clustering“ wurden die relativen Expressionsdaten aller Zytokin-behandelten Proben zusammengefügt und miteinander verglichen. Zudem wurde durch Anlegen zweier Filterkriterien die Datenmenge reduziert, da in die folgenden Bewertungen nur noch Gene einbezogen wurden, deren relative Expression durch Zytokin-Behandlung mindestens um den Faktor 2 verändert wurde bei einer statistischen Signifikanz von  $p \leq 0,01$ . Als Ergebnis dieser Analyse ergab sich, daß in Hep3B-Zellen 805 Gene mindestens durch eine der drei Zytokin-Behandlungen differentiell transkribiert wurden. Im Hinblick auf die Fragestellung, welche Signaltransduktionskaskaden in Hep3B-Zellen für die Aktivierung der APP-Transkription verantwortlich sind und welche Gemeinsamkeiten oder Unterschiede die durch IL-1 $\beta$ -, TNF $\alpha$ - oder IL-6-induzierten Signalwege haben, fielen 4

Gengruppen auf (**Abb. 22**). Interessanterweise gab es neben einer großen Gruppe von Genen, deren Transkription in gleichem Maße durch IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  angeregt wurde (Gruppe 3), auch zwei Gruppen, die jeweils nur durch eine der beiden Behandlungen beeinflussbar war (Gruppe 1&2). Unter den in Gruppe 3 repräsentierten Genen befindet sich z.B. Interleukin-8 und TNF $\alpha$  deren Expression nachgewiesenermaßen NF $\kappa$ B-abhängig ist (Osawa *et al.*, 2002; O'Connell *et al.*, 1995), so daß davon ausgegangen werden kann, daß der für die Expression dieser Gene verantwortliche Mechanismus eine NF $\kappa$ B-Aktivierung ist. Sowohl IL-1 $\beta$  als auch TNF $\alpha$  sind klassische NF $\kappa$ B-Aktivatoren. Wie auch bei der vorausgegangenen Analyse bildeten die IL-6-induzierten/inhibierten Gene eine eigenständig, von den anderen klar zu unterscheidende Gruppe (Gruppe 4).

#### **4.3 Beteiligung der Proteinkinase C an der transkriptionellen Regulation der CRP-Synthese.**

Sowohl in primären humanen Hepatozyten als auch in der stabil transfizierten HepG2-CRP-Luciferase-Zelllinie konnte eine Phorbolster-induzierte CRP-Expression detektiert werden.

Der Phorbolster PDBu ist als Aktivator der Proteinkinase-C (PKC) literaturbekannt, und die Behandlung primärer humaner Hepatozyten führte zu einer Translokation der Kinase zur Kernmembran, was ein Indikator für die Aktivität der PKC ist. Die Hemmung der Proteinkinase-C-Aktivität durch den spezifischen chemischen Inhibitor LY333531 führte sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene zur Blockade der Phorbolster-induzierten CRP-Synthese.

Die beobachtete Beteiligung der Proteinkinase-C an der transkriptionellen Regulation der CRP-Expression stellt einen neuen Ansatz zur Erklärung verstärkter CRP-Bildung als Symptom verschiedener systemischer Erkrankungen dar. Die Proteinkinase-C-Signaltransduktion wird unter physiologischen Bedingungen z.B. durch Ligand-Rezeptor-Interaktionen der Faktoren Thrombin (Maekawa *et al.*, 1996), Interleukin-8 (Wigmore *et al.*, 1997) oder Angiotensin II (Sun *et al.*, 2002) aktiviert. Durch die Liganden-Bindung kommt es an den entsprechenden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) zur Konformationsänderung und nachfolgend unter ATP-Verbrauch zur Aktivierung der membranären Phospholipase-C (PLC). Letztere generiert durch Spaltung von Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) die beiden „Second-Messenger“ Signalmoleküle Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> induziert unter anderem, vermittelt durch spezifische Rezeptoren, die Freigabe von intrazellulärem Calcium, während DAG als PKC-Aktivator fungiert.

Phorbolster wie PDBu bewirken als DAG-Analoga die Aktivierung der PKC. Die Expression der bereits erwähnten Proteine Interleukin-8 und Thrombin ist unter den Bedingungen einer systemischen Entzündung stark erhöht, womit diese Faktoren als endogene Aktivatoren der Proteinkinase-C und damit einer verstärkten CRP-Synthese in Frage kommen, insbesondere, da die Rezeptoren für Thrombin und IL-8 in hohem Maße auf der Hepatozyten-Oberfläche zu finden sind (Maekawa *et al.*, 1996 und Wigmore *et al.*, 1997). Das Chemokin Interleukin-8 scheint desweiteren an der Entstehung und Progression der Atherosklerose beteiligt zu sein (Boisvert *et al.*, 2004), genauso wie die wichtige Rolle von Angiotensin II im Rahmen verschiedener Herzkreislauf-Erkrankungen bekannt ist. Deswegen lag es nahe, den Effekt von Interleukin-8 auf die CRP-Synthese in PHH zu untersuchen. Sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene konnte nach Inkubation mit IL-8 eine signifikant gesteigerte CRP-Expression detektiert werden, was die These, daß IL-8 als endogener PKC-Aktivator für erhöhte CRP-Plasmaspiegel verantwortlich ist, untermauert.

Weitere Untersuchungen im Testsystem des CRP-Luciferase-Assays unter Verwendung eines chemischen IKK-Komplex-Inhibitors konnten zeigen, daß die Phorbolster-induzierte Aktivierung der CRP-Transkription teilweise NF $\kappa$ B-abhängig ist. Dieses Ergebnis korreliert mit Beobachtungen aus anderen zellulären System in denen gezeigt werden konnte, daß ausgehend von der Proteinkinase-C eine Signalweitergabe auf Faktoren der NF $\kappa$ B-Signaltransduktions-Kaskade erfolgt (Su *et al.*, 2002 und Moscat *et al.*, 2003).

Eine NF $\kappa$ B-Beteiligung an der Phorbolster-induzierten Signaltransduktion konnte in transient mit einem NF $\kappa$ B-Reporter-Konstrukt transfizierten HepG2-Zellen bestätigt werden. Die in diesem Testsystem durch PDBu induzierte Luciferase-Aktivität wurde komplett durch den spezifischen PKC-Inhibitor LY333531 und partiell durch den IKK-Komplex-Inhibitor aufgehoben, was darauf hindeutet, daß unterhalb der Proteinkinase-C neben NF $\kappa$ B weitere Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen. Als potentieller Kandidat kommt hier C/EBP $\beta$  in Frage, dessen Aktivierung durch die PKC von Trautwein *et al.* beschrieben wurde (1993).

#### **4.4 IL-1 $\beta$ -induzierte CRP-Transkription in primären humanen Hepatozyten**

Bei der Auswertung der durch globale Genexpressionsanalyse und qRT-PCR gewonnenen Expressionsdaten in Zytokin-stimulierten PHH und Hep3B war aufgefallen, daß einige in Hep3B-Zellen ausschließlich durch IL-6-induzierbare APP in PHH sowohl durch IL-1 $\beta$ - als auch IL-6-Behandlung vermehrt exprimiert wurden. Zu diesen Genen zählten „Suppressor of Cytokine Signaling 3“ (SOCS3), Haptoglobin (HP), Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP), C-reaktives Protein (CRP), sowie Fibrinogen alpha und beta (FGA/FGB). Als

möglicher Erklärungsansatz für dieses Phänomen kam eine Interleukin-1 $\beta$ -induzierte IL-6-Produktion, die wiederum zur Expression der entsprechenden IL-6-Zielgene führt, in Frage. Durch qRT-PCR konnte gezeigt werden, daß es durch IL-1 $\beta$ -, nicht aber durch TNF $\alpha$  –Behandlung zu einer verstärkten IL-6-Transkription in PHH kam, während Hep3B-Zellen auf keines der Zytokine mit einer IL-6-Synthese reagierten, was auf einen möglichen genetischen Defekt in der Sequenz des IL-6-Gens in der Hepatomazelllinie hindeutet. Desweiteren wurde deutlich, daß die Interleukin-1 $\beta$  ausgelöste APP-Expression Proteinbiosynthese-abhängig war, da eine gleichzeitige Behandlung primärer humaner Hepatozyten mit Cycloheximide und IL-1 $\beta$  zu einer Hemmung der IL-1 $\beta$ -induzierten CRP-Bildung führte. Als für die CRP-, HP- und SOCS3-Expression verantwortliches Protein, dessen Neusynthese durch IL-1 $\beta$  induziert wird, konnte durch den Einsatz neutralisierender IL-6-Antikörper und eines JAK-Kinase-Inhibitors Interleukin-6 identifiziert werden. Durch die Infektion von PHH mit einer dominant-negativen Variante des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins konnte gezeigt werden, daß der für die IL-6-Expression verantwortliche Mechanismus durch eine Aktivierung eines NF $\kappa$ B-Signalweges, der I $\kappa$ B $\alpha$ -inhibierbar ist, zustande kommt.

Die Interleukin-1 $\beta$ -induzierte IL-6-Expression ist in der Literatur bereits für verschiedene Zelltypen wie humane Osteoblasten (Takaoka *et al.* 1999), Fibroblasten (Miyazawa *et al.* 1998) oder auch murinen Darmmukosa-Zellen (Kwon *et al.* 2005) beschrieben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß IL-1 $\beta$ -induziert und NF $\kappa$ B-vermittelt exprimiertes IL-6-Protein in autokriner Weise eine vermehrte CRP-Synthese in PHH auslöst. Da TNF $\alpha$  die Aktivierung der NF $\kappa$ B-Untereinheiten p50/NF $\kappa$ B1 und p65/RelA induziert, aber nicht zu einer IL-6-Expression und damit auch zu keiner CRP-Synthese in PHH führt, ist anzunehmen, daß an der IL-1 $\beta$ -induzierten IL-6-Expression atypische NF $\kappa$ B-Untereinheiten wie z.B. p52/NF $\kappa$ B2,c-Rel oder RelB beteiligt sind.

#### **4.5 Signaltransduktion in Hep3B-Zellen**

Zur Charakterisierung der Hep3B-Zelllinie wurde diese mit unterschiedlichen Zytokinen und Reagenzien behandelt und im Anschluß daran die daraus resultierenden Folgen auf die Genexpression sowie die posttranslationelle Modifikation verschiedener Proteine untersucht. Desweiteren konnte für einige ausgewählte Signaltransduktionskomponenten, die potentiell an der transkriptionellen Regulation verschiedener Akute Phase Proteine beteiligt sind, die relative basale Expression bestimmt werden.



#### 4.5.1 Die IL-6-Signaltransduktion

In Hep3B-Zellen löste die Inkubation mit dem Zytokin IL-6 weitreichende Veränderungen in der Genexpression aus. Im Vergleich zur IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -Behandlung war die Expression von CRP, HP und SOCS3 ausschließlich durch IL-6 induzierbar (s.o.). Unter Zuhilfenahme chemischer Kinase-Inhibitoren und der siRNA-Technologie konnte die Beteiligung verschiedener JAK-Kinasen und des Transkriptionsfaktors STAT3 nachgewiesen werden. Bereits der Einsatz des spezifischen JAK-Kinase-Inhibitors in der Konzentration von 50 nM führte zu einer kompletten Inhibition der IL-6-induzierten CRP-Expression, was auf eine zentrale Rolle dieser Kinase in dieser Signalkaskade schließen läßt. Durch Inhibition der Expression der JAK-Kinase-Isoformen JAK1, JAK2 und JAK3 zeigte sich, daß JAK1 essentiell für die IL-6-induzierte CRP-Expression war, während JAK2 und JAK3 eine untergeordnete bzw. keine Rolle spielten (**Abb.37**). Dieser Befund wurde durch die Tatsache bestätigt, daß JAK1 die in Hep3B am stärksten vorherrschende Isoform dieser Kinase-Familie war, wohingegen die detektierte JAK2-Menge nur ca.  $\frac{1}{4}$  und die JAK3-Menge nur ca.  $\frac{1}{2500}$  der gebildeten JAK1-mRNA entsprach (**Tab.6**). Zhang *et al.* (2000) beschreibt in seiner Arbeit die direkte Association von STAT3 und JAK1, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch Tyrosin 705-Phosphorylierung führt. Auch in Hep3B-Zellen führt IL-6 Behandlung zur Tyrosin-705-Phosphorylierung (**Abb.58**) und STAT3-Translokation in den Nukleus (**Abb.39**). Ferner führt eine STAT3-Expressionshemmung durch die Transfektion von Hep3B-Zellen mit spezifischen si-STAT3-Oligonukleotiden zur praktisch vollständigen Inhibition der IL-6-induzierten CRP-Expression. Damit konnte der Befund, daß JAK1 und STAT3 zentrale Komponenten der IL-6-induzierten Signaltransduktion in PHH darstellen (Klein *et al.* 2005), auf die Hepatomazelllinie Hep3B ausgedehnt werden, vollkommen unabhängig davon, ob neben diesem Faktor noch weitere Proteine an der transkriptionellen Aktivierung von IL-6-Zielgenen beteiligt sind.

#### 4.5.2 Die Rolle der CCAAT/Enhancer-bindenden Proteine in der Expressionskontrolle des C-reaktiven Proteins

Vertreter der Familie der CCAAT/Enhancer-bindenden Protein spielen in unterschiedlichen Geweben eine wichtige Rolle als transkriptionelle Regulatoren der Proteinexpression. Ihre Aktivität hat weitreichenden Einfluß auf die Adipozyten-Differenzierung (Darlington *et al.* 1998) und die Expression einer Reihe von am Fettstoffwechsel beteiligten Enzyme (Wang *et al.* 1995). Ferner regulieren C/EBPs die Hepatozyten-Proliferation (Timchenko *et al.* 1997) und kontrollieren die Expression einer Vielzahl von Proteinen, die für die metabolische

Aktivität dieses Zelltyps verantwortlich sind. Die einzelnen Vertreter der C/EBP-Familie verfügen am C-terminalen Ende im Bereich der Aminosäuren 55-65 über ein hohes Maß an Homologie (>90 %), hingegen unterscheiden sich die Sequenzen der einzelnen Isoformen sehr stark im N-Terminus, wo die Homologie nur noch bei <20 % liegt (Ramji *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die Verantwortlichkeit der Isoformen C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  für die Regulation der APP- und APRIP-Expression in Hep3B-Zellen gelegt. Es hat sich gezeigt, daß die einzelnen Isoformen in bezug auf ihre basale Expression in unbehandelten Hep3B-Zellen stark variierten, und C/EBP $\alpha$  die am stärksten exprimierte Form war, während C/EBP $\beta$  ca. 100-fach und C/EBP $\delta$  ca. 300-fach schwächer transkribiert wurden (**Tab.7**).

Gensequenzen, die für C/EBP $\alpha$  kodieren und in verschiedenen Spezies wie z.B. Mensch, Maus, Ratte, Huhn, Zebrafisch etc. identifiziert worden sind, verfügen über ein großes Maß an Homologie (Landschulz *et al.*, 1988 (II); Xanthopoulos *et al.*, 1989; Calkhoven *et al.*, 1992). Die C/EBP $\alpha$ -Expression variiert in Abhängigkeit vom betrachteten Zelltyp sehr stark und ist in den Geweben des Gastrointestinaltraktes, der Leber, der Lunge, der Placenta und in Adipocyten am stärksten ausgeprägt (Antonson *et al.*, 1995).

In dieser Arbeit wurde die Beteiligung von C/EBP $\alpha$  an der transcriptionellen Regulation der CRP-Expression gezeigt. Die alleinige Überexpression des Transkriptionsfaktors führte in Hep3B-Zellen zu einer deutlichen Induktion der CRP-Transkription, die durch zusätzliche Behandlung der transfizierten Zellen mit IL-1 $\beta$  oder IL-6 verstärkt wurde. Interessanterweise scheint die transkriptionelle Aktivität von C/EBP $\alpha$  nicht von einer vorausgehenden Aktivierung durch Kinasen abhängig zu sein, da bereits eine einfache Vergrößerung der intrazellulären C/EBP $\alpha$ -Menge ausreichend war, die Transkription der entsprechenden Zielgene, in diesem Fall CRP, zu induzieren. Ferner konnte gezeigt werden, daß eine Hemmung der C/EBP $\alpha$ -Bildung durch eine Transfektion mit si-C/EBP $\alpha$  eine ca. 90 %-ige Hemmung der IL-6-induzierten CRP-mRNA-Synthese zur Folge hatte. Letzterer Befund in Verbindung mit der Beobachtung, daß TNF $\alpha$ -Behandlung zu einem starken Abbau von C/EBP $\alpha$  führt, kann als Erklärung für das Phänomen, daß TNF $\alpha$ -Stimulation die IL-6-induzierte CRP-Expression unterdrückt, dienen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Beteiligung von C/EBP $\alpha$  an der durch IL-6 ausgelösten CRP-mRNA-Produktion in Hep3B-Zellen durch drei experimentelle Ansätze belegt wurde: 1) Die Überexpression von C/EBP $\alpha$  verstärkt die basale und induzierte CRP-Transkription. 2) Künstlicher „Knock-down“ von C/EBP $\alpha$  durch siRNA inhibierte die IL-6-

induzierte CRP-Synthese. 3) Natürlicher „Knock-down“ von C/EBP $\alpha$  durch TNF $\alpha$ -Behandlung der Zellen führt zur Hemmung der IL-6-abhängigen CRP-Expression.

Die C/EBP Isoform beta wurde ursprünglich als verantwortlicher Transkriptionsfaktor der IL-1 $\beta$ -induzierten IL-6-Expression beschrieben und trägt den Beinamen Nukleärer Faktor IL-6 (NF-IL6) (Akira *et al.*, 1990). Desweiteren wurde von Agrawal *et al.* im Jahre 2001 in einem Luciferase-Assay die Aktivierung des proximalen humanen CRP-Promoters (-125/+9) durch überexprimiertes C/EBP $\beta$  (und p50/NF $\kappa$ B1) beschrieben. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, daß die Transkription endogenen CRPs in Hep3B-Zellen durch C/EBP $\beta$ -Überexpression induziert werden kann und eine zusätzliche Behandlung mit IL-1 $\beta$  oder IL-6 die CRP-Expression synergistisch verstärkt. Die alleinige Überexpression von p50/NF $\kappa$ B1, die in Agrawals Arbeit den CRP-Promoter zu aktivieren vermochte, hatte auf die Expression endogenen CRPs in Hep3B keinen Einfluß.

Bedauerlicherweise ist es in dieser Arbeit nicht gelungen die C/EBP $\beta$ -Proteinbildung durch siRNA-Oligonukleotid-Transfektion zu inhibieren, sodaß die Bedeutung von C/EBP $\beta$  für die transkriptionelle Regulation von Akute Phase Proteinen nur anhand der durch Überexpression generierten Daten beurteilt werden kann. Die wichtige Rolle, die C/EBP $\beta$  in der IL-6-induzierten Genexpression spielt, wird aber durch die experimentellen Befunde von Ramji *et al.* aus dem Jahre 1992 unterstützt, da hier durch „Elektro Mobility Shift Assays“ (EMSA) gezeigt werden konnte, daß die transkriptionelle Aktivität von C/EBP $\beta$  durch IL-6-Stimulation gesteigert werden kann.

Wie seine nahen Verwandten wurde die C/EBP Isoform delta in verschiedenen Spezies nachgewiesen und charakterisiert. Unter basalen Bedingungen ist C/EBP $\delta$  in den meisten Geweben praktisch nicht zu finden. C/EBP $\delta$ -mRNA läßt sich aber in Leber, Niere und Lunge der Maus nach peritonealer LPS-Injektion detektieren (Kinoshita *et al.*, 1992).

In ruhenden Hep3B-Zellen wurde das C/EBP $\delta$ -Gen ca. 300-400-fach schwächer transkribiert als C/EBP $\alpha$  (**Tab.7**) und war durch Western-Blot-Analyse nicht nachzuweisen (**Abb.43**). Durch IL-1 $\beta$ -Behandlung der Zellen konnte die C/EBP $\delta$ -mRNA-Synthese stark induziert werden (**Abb.57**) und C/EBP $\delta$ -Protein wurde detektierbar (**Abb.43**). Die Transfektion von Hep3B-Zellen mit spezifischen siRNA-Oligonucleotiden, die die C/EBP $\delta$ -Expression unterdrückten, inhibierte praktisch vollständig die IL-6-induzierte CRP-Synthese, was auf eine wichtige Rolle von C/EBP $\delta$  in der transkriptionellen Expressionskontrolle dieses Akute Phase Proteins hindeutet. Die Tatsache, daß C/EBP $\delta$  einer der Transkriptionsfaktoren ist, dessen Expression durch IL-1 $\beta$ -Behandlung angeregt wird, in Verbindung mit der

Beobachtung, daß C/EBP $\delta$  die Expression IL-6-abhängiger Gene vermittelt, kommt als Erklärung für die synergistische Aktivierung der CRP-Expression durch IL-1 $\beta$  und IL-6 in Frage. Die C/EBP $\delta$ -Aminosäure-Sequenz beinhaltet, wie die von C/EBP $\alpha$  und C/EBP $\beta$  eine bZIP-Domäne und ist damit sowohl zur Homo- als auch zur Heterodimer-Bildung mit anderen C/EBP-Isoformen in der Lage. Drei Transaktivierungsdomänen befähigen C/EBP $\delta$ -Proteinkomplexe ferner zur Genexpression. Kinoshita *et al.* hat in seiner 1992 publizierten Arbeit gezeigt, daß C/EBP $\delta$  mit C/EBP $\beta$  *in vitro* transkriptionell aktive Heterodimere bildet. Im Promoter des humanen CRP-Gens befinden sich verschiedene potentielle C/EBP-Bindungsstellen, die als Interaktionspartner sowohl für Homodimere als auch Heterodimere verschiedener C/EBP-Isoformen denkbar sind.

Zusammenfassend kann für die Familie der CCAAT/Enhancer-bindenden Proteine gesagt werden, daß sie entscheidend an der Kontrolle der CRP-Expression in Hep3B-Zellen beteiligt sind. Die Tatsache, daß sowohl die C/EBP-Isoforme alpha, als auch beta und delta die IL-6-induzierte Genexpression vermitteln, deutet auf eine CRP-Promoter-Aktivierung durch C/EBP-Heterodimere hin. Da die alleinige Überexpression von C/EBP $\alpha$  und C/EBP $\beta$  die CRP-Transkription hochsignifikant verstärkte, ist außerdem eine Interaktion mit konstitutiv aktiven Transkriptionsfaktoren anderer Proteinfamilien denkbar. In diesem Kontext kämen als mögliche Komplex-Partner STAT3 und NF $\kappa$ B-Untereinheiten in Frage, da beide Faktoren über basale transkriptionelle Aktivität verfügen und Agrawal *et al.* (2003) in seiner Arbeit zeigt, daß eine gleichzeitige Überexpression von p50/NF $\kappa$ B1, p65/RelA, STAT3 und C/EBP $\beta$  zu einer maximalen CRP-Transkription in Hep3B-Zellen führt. Anhand der in Hep3B-Zellen gewonnenen experimentellen Befunde erscheint eine unterschiedliche Rolle von C/EBP $\alpha$  und C/EBP $\delta$  bei der Regulation Genexpression von Akute Phase Proteinen wahrscheinlich. Da im menschliche Körper im Zustand der Akuten Phase Reaktion immer ein Gemisch aus Zytokinen als Auslöser einer differenziellen Genexpression auf die Gewebe der Leber einwirkt, ist anzunehmen, daß es unter diesen Umständen zu einem Abbau von C/EBP $\alpha$  kommt und somit dieser Faktor *in vivo* nicht unbedingt für die hohen CRP-Plasmaspiegel verantwortlich ist. Unter Umständen ermöglichen der unter basalen Bedingungen sehr stark exprimierte Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$  dem Organismus sehr schnell mit einer differentiellen Genexpression auf die Anforderungen einer zunächst lokalen Entzündung zu reagieren. Zu den potentiellen C/EBP $\alpha$ -Zielgenen gehört unter anderem auch C/EBP $\delta$ , da sich im C/EBP $\delta$ -Promoter im Bereich zwischen -1200 und -900 bp zwei C/EBP-Bindungs-Motive befinden (Genomatix Promoteranalyse). C/EBP $\delta$  könnte seinerseits für eine zweite

Welle der induzierten Genexpression einer Reihe von Akute Phase Proteine verantwortlich sein, insbesondere da Kinishota *et al.* bereits 1992 zeigen konnte, daß C/EBP $\delta$  sowohl als Homo- als auch als Heterodimer z.B mit C/EBP $\beta$  über eine stärkere Affinität zu C/EBP-Bindungs-Sequenzen in der DNA verfügt als andere Isoformen der gleichen Familie. Ferner ist C/EBP $\delta$  *in vitro* ein deutlich potenterer Transaktivator. Unterstützt wird diese These auch durch die Arbeit von Ray *et al.* (1994), in der aus Kanninchenleber-Gewebsproben CEBP $\beta$ -C/EBP $\delta$ -Proteinkomplexe isoliert werden konnten, die in DNA-Bindungs-Assays eine hohe Affinität zu C/EBP-Motive des Serum Amyloid A-Promotors aufwiesen. Die basale C/EBP $\beta$ -Expression in Hep3B-Zellen ist sehr hoch und ließ sich weder auf mRNA- noch auf Proteinebene durch die Behandlung mit den Zytokinen IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  oder IL-6 weiter steigern. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, daß C/EBP $\beta$  in diesem zellulären Modell sowohl bei der Expression früher als auch später Akute Phase Proteine eine wichtige Rolle spielt.

#### 4.5.3 I $\kappa$ B $\xi$ als Regulator der Expression verschiedener Akute Phase Proteine

I $\kappa$ B zeta (I $\kappa$ B $\xi$ ), das auch als „Molecule possessing ankyrin-repeats induced by Lipopolysaccharide“ (MAIL) bezeichnet wird, wurde im Jahre 2000 von Kitamura *et al.*, als ein in den lymphatischen Geweben der Maus exprimiertes Protein beschrieben. I $\kappa$ B $\xi$ /MAIL wird nach bisherigen Erkenntnissen hauptsächlich in B-Lymphozyten und Makrophagen exprimiert, konnte aber auch in kultivierten embryonalen Nierenzellen (Yamazaki *et al.*, 2001) und Fibroblasten (Kitamura *et al.*, 2000) detektiert werden. MAIL gehört zu den Proteinen der I $\kappa$ B-Familie, und ähnlich wie bei I $\kappa$ B $\alpha$  kann die intrazelluläre Lokalisation dieses Proteins variieren. Während in B-Lymphozyten MAIL hauptsächlich im Zytosol anzutreffen ist, wurde es in Makrophagen und Fibroblasten ausschließlich im Zellkern detektiert (Haruta *et al.*, 2001; Kitamura *et al.*, 2000, 2003)

Die LPS-ausgelöste Signaltransduktion, die zur MAIL-Expression führt, scheint durch den Toll-Like-Receptor 4 (TLR4) vermittelt zu werden, da in U937-Zellen die LPS-induzierte MAIL-Expression durch die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit neutralisierenden TLR4-Antikörpern gehemmt werden konnte (Kitamura *et al.*, 2002). Ferner konnte die MAIL-Expression in der Milz von Mäusen nach peritonialer LPS-Injektion durch eine inaktivierende Mutation des *tlr4*-Genes verhindert werden (Kitamura *et al.*, 2002). MAIL-k.o.-Mäuse entwickeln Hautläsionen, die denen einer atopischen Dermatitis ähnlich sind, weisen pathologische Veränderungen der *Conjunctiva* auf und reagieren auf Zytokin-Injektion mit

einer veränderten Expression verschiedener Proteine, die am inflammatorischen Geschehen beteiligt sind, wie Lipocalin 2 (LCN2), Interleukin-18 (IL-18) und C/EBP $\delta$  (Yamamoto *et al.*, 2004). In der Zytokin-induzierten IL-6-Expression scheint I $\kappa$ B $\xi$  eine wichtige Rolle zu spielen, da I $\kappa$ B $\xi$ -(-/-)-Makrophagen praktisch nicht zur IL-1 $\beta$ - bzw. TNF $\alpha$ -induzierten IL-6-Synthese fähig sind (Yamamoto *et al.*, 2004).

Desweiteren wurde I $\kappa$ B $\xi$  als negativer Regulator verschiedener NF $\kappa$ B-abhängiger Gene beschrieben, da es offensichtlich in der Lage ist, die Interaktion von p65/RelA-p50/NF $\kappa$ B1-Heterodimeren mit den entsprechenden DNA-Bindungsstellen zu inhibieren (Yamazaki *et al.*, 2001). In einer murinen Monozyten-Zelllinie (RAW264.7-Zellen) führt eine I $\kappa$ B $\xi$ -Überexpression zu einer verstärkten LPS-induzierten IL-6-Expression und einer eingeschränkten TNF $\alpha$ -Synthese (Motoyama *et al.*, 2004). Als Ursache für diese Effekt kommt die Fähigkeit von MAIL, mit der inhibitorischen NF $\kappa$ B-Untereinheit p50 Komplexe auszubilden in Frage, was zu einer Konkurrenz dieses Agglomerates mit den transkriptionell aktiven p65/RelA-p50/NF $\kappa$ B1-Heterodimeren um die DNA-Bindung führt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß I $\kappa$ B $\xi$  eine wichtige Rolle in der transkriptionellen Regulation verschiedener Akute Phase Protein in der Hepatomazelllinie Hep3B spielt. Durch I $\kappa$ B $\xi$ -Überexpression und die Hemmung dieses Proteins durch Verwendung der siRNA-Technologie ist es gelungen, eine Beteiligung von I $\kappa$ B $\xi$  an der IL-1 $\beta$ - und IL-6-induzierten Genexpression zu belegen.

Die IL-1 $\beta$ -induzierte Expression von Serum Amyloid A2 (SAA2), LCN2 und „Ets-homologue factor“ (EHF) konnten durch Transfektion mit si-I $\kappa$ B $\xi$ -Oligonukleotiden zu praktisch 100% gehemmt werden, während sowohl die TNF $\alpha$ - als auch IL-1 $\beta$ -induzierte Transkription des klassischen NF $\kappa$ B-Zielgens IL-8 von der si-I $\kappa$ B $\xi$ -Transfektion unbeeinflusst blieb. Ferner wurde die IL-6-induzierte CRP-Expression zu ca. 80% inhibiert. Eine Überexpression von I $\kappa$ B $\xi$  löste eine ca. 2-3-fach erhöhte LCN2- und C/EBP $\delta$ -Transkription verglichen mit den basalen Expressionswerten aus und verstärkte in vergleichbarem Maße die IL-1 $\beta$ -induzierte Expression der beiden genannten Gene. Auf die basale und IL-6-induzierte CRP-mRNA-Synthese hatte eine vermehrte I $\kappa$ B $\xi$ -Expression keinen signifikanten Einfluß, was darauf schließen läßt, daß die endogenen I $\kappa$ B $\xi$ -Spiegel ausreichend sind, die maximale Expression dieses Akute Phase Proteins zu vermitteln.

Auf den ersten Blick scheint eine Beteiligung von I $\kappa$ B $\xi$  an der IL-6-induzierten CRP-Expression unwahrscheinlich und wenig verständlich. Vor dem Hintergrund, daß I $\kappa$ B $\xi$  aber

für die Expression des Transkriptionsfaktors C/EBP $\delta$  verantwortlich ist, wird deutlich, daß die I $\kappa$ B $\xi$ -Inhibierung durch siRNA auch Einfluß auf die IL-6-induzierte CRP-Synthese haben muß, da C/EBP $\delta$ , wie zuvor gezeigt werden konnte, ein essentieller Faktor der IL-6-Signaltransduktionskaskade ist. I $\kappa$ B $\xi$  ist also nicht nur unmittelbar für die Expression IL-1 $\beta$ -induzierbarer Gene verantwortlich, sondern beeinflusst indirekt durch die Regulation der C/EBP $\delta$ -Expression die IL-6-ausgelöste Transkription. Durch diese Charakteristika stellt I $\kappa$ B $\xi$  ein Bindeglied zwischen den sehr unterschiedlichen Signaltransduktionswegen dar, die auf der einen Seite durch IL-1 $\beta$  und auf der anderen Seite durch IL-6 aktiviert werden. Ferner kann durch eine vermehrte I $\kappa$ B $\xi$ -Synthese als Folge der IL-1 $\beta$ -Behandlung die synergistisch verstärkte CRP-Expression nach einer kombinierten Behandlung von Hep3B-Zellen mit IL-1 $\beta$  und IL-6 erklärt werden.

Eine graphische Darstellung der Vorgehensweise bei der Bearbeitung der Fragestellungen dieser Dissertation befindet sich im Anhang auf Seite 122.

## **5 Zusammenfassung**

Im Verlaufe der Akuten Phase Reaktion, die als systemischer inflammatorischer Prozess gekennzeichnet ist, vollzieht der Organismus eine Reihe von neuroendokrinen, hämatopoetischen und metabolischen Anpassungsreaktionen. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die durch lokal produzierte proinflammatorische Zytokine induzierte Expression sogenannter Akute Phase Proteine. Das C-reaktive Protein (CRP) repräsentiert den Prototyp eines von Hepatozyten ins Plasma sezernierten Akute Phase Proteins. Neben seiner Rolle als diagnostischer Marker lokaler und systemische Entzündungsreaktionen des Körpers, sowie als Prediktor des zukünftigen kardiovaskulären Risikos, deuten die Ergebnisse verschiedener wissenschaftlicher Arbeiten auf proatherogene Eigenschaften dieses Proteins hin. Dieser Umstand nominiert die Mechanismen, die zu einer vermehrten CRP-Expression führen, als potentiellen Angriffspunkt pharmakologischer Interventionen zur Verhütung der Atherosklerose-Entstehung und Progression. Solange ein spezifischer Rezeptor, der die proatherogenen Effekte des CRPs vermittelt, nicht benannt werden kann, und somit die Identifizierung eines CRP-Antagonisten nicht möglich ist, erweist sich die Entwicklung eines CRP-Expressions-Inhibitors als vielversprechender Ansatz.

Trotz weitreichender Bemühungen sind die Signaltransduktionskaskaden, die zur Aktivierung der CRP-Transkription führen, nicht klar definiert und sehr widersprüchlich beschrieben. Aus diesem Grunde war es ein Ziel dieser Arbeit, die molekularen Mechanismen, die für die vermehrte Expression des CRP-Gens verantwortlich sind, weiter zu entschlüsseln und potentielle Ziele für pharmakologisch wirksame chemische Strukturen zu identifizieren.

Zu diesem Zweck wurden primäre humane Hepatozyten (PHH), die Hep3B-Zelllinie und eine stabil transfizierte CRP-Promoter-Luciferase Zelllinie als Testsysteme etabliert und charakterisiert. Das biologische Milieu der Akuten Phase Reaktion sollte durch die Stimulation der zellulären Modelle mit den proinflammatorischen Zytokinen Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), Tumornekrose Faktor alpha (TNF $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6), dem Chemokin Interleukin-8 (IL-8) und anderen chemischen und biologischen Aktivatoren der Genexpression simuliert werden.

Genexpressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene, sowie Ergebnisse aus Reporter-Gen-Assays ermöglichten die Identifizierung der Proteinkinase C und deren Aktivator IL-8 als potentiell verantwortliche Auslöser einer forcierten CRP-Biosynthese. Hiermit wurde ein weiteres bisher nicht bekanntes Bindeglied zwischen inflammatorischen Erkrankungen und proatherogenen Effekten hergestellt.

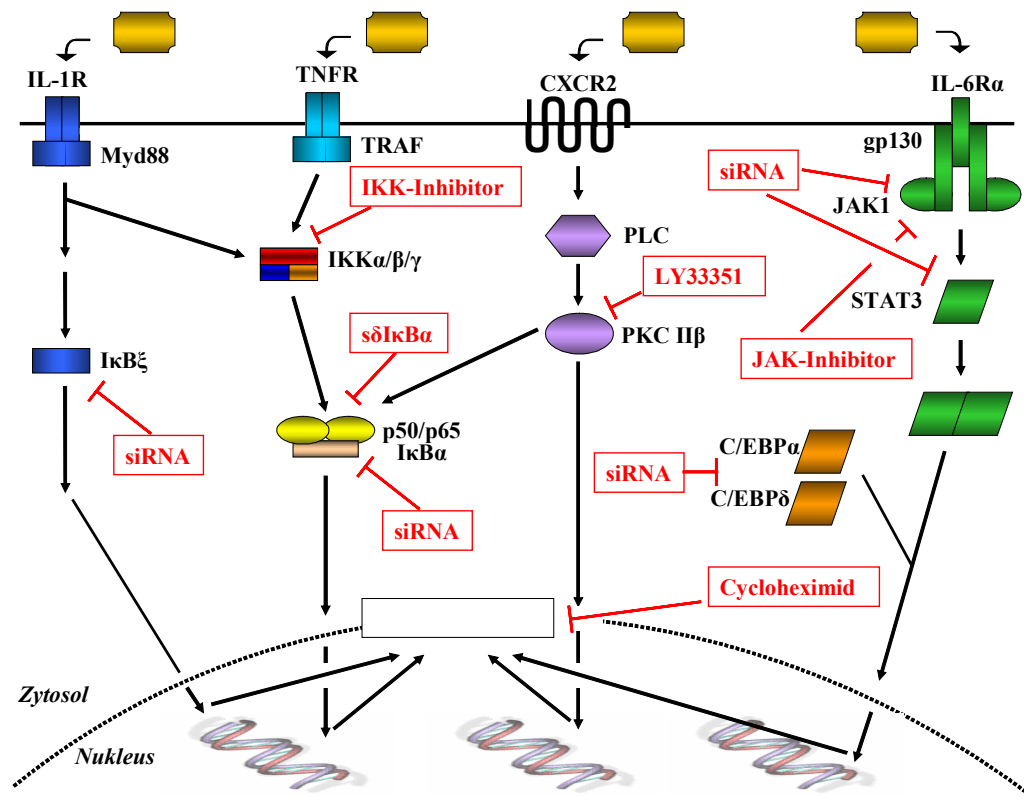
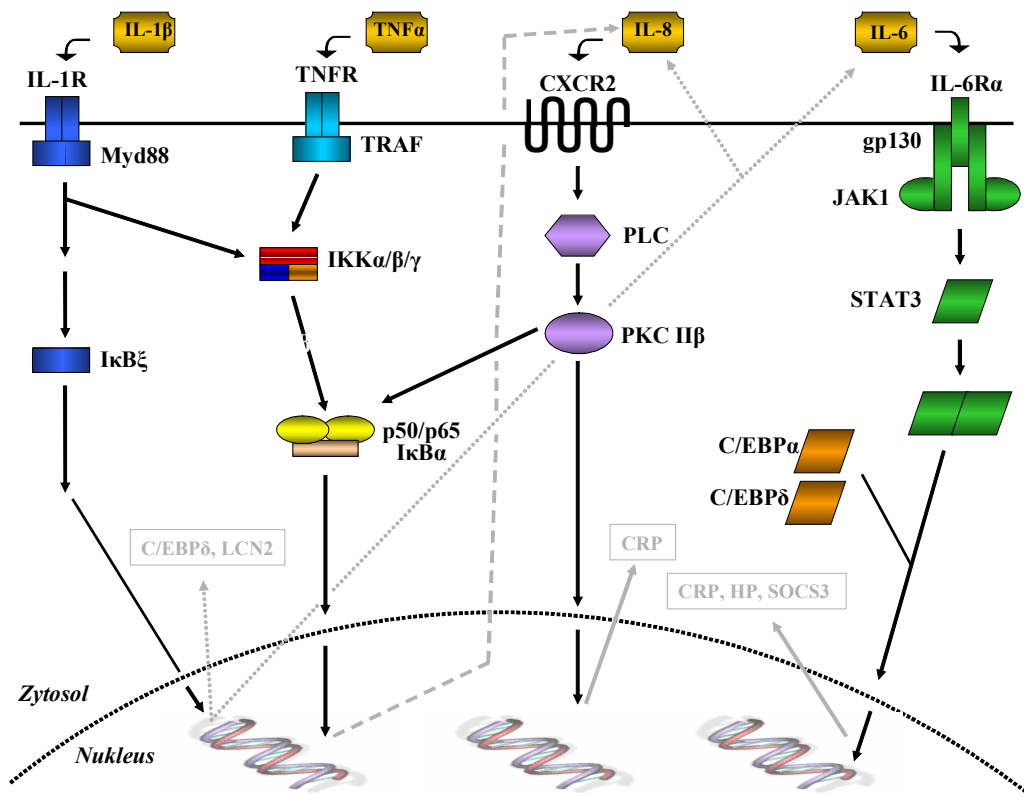


Ferner konnte gezeigt werden, daß in PHH die IL-1 $\beta$ -induzierte CRP-Expression durch endogenes autokrin wirksamen IL-6 vermittelt wird. In allen drei zellulären Testsystemen wurde die zentrale Rolle der NF $\kappa$ B-Signaltransduktion, sowie die der JAK/STAT-Signalkaskade bei der Regulation der CRP-Expression und der Akute Phase Proteine Haptoglobin (HP), „Suppressor of cytokine signaling-3“ (SOCS3) und IL-8 nachgewiesen. Die Bedeutung der C/EBP-Transkriptionsfaktor-Familie als direkte Aktivatoren der CRP-Transkription oder als potentielle Interaktionspartner transkriptionell aktiver Protein wie STAT3 wurde belegt und Hinweise darauf gefunden, daß verschiedene Isoformen dieser Protein-Familien in unterschiedlichen Phasen der Inflammation für die differentielle Genexpression verantwortlich sind.

Die molekularen Unterschiede der Signaltransduktionskaskaden, die zur Induktion der Genexpression durch die NF $\kappa$ B-Aktivatoren IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  führen wurden detailliert untersucht und der Transkriptionsfaktor I $\kappa$ B $\xi$  als der potentiell verantwortliche Faktor identifiziert, der zur Expression von IL-1 $\beta$ -induzierbaren Genen führt, nicht aber an der TNF $\alpha$ -aktivierten Signaltransduktion beteiligt ist.

Die globale Genexpressionsanalyse von Zytokin-behandelten PHH und Hep3B-Zellen und die statistische Bewertung der Expressionsprofile ermöglichte die Definierung verschiedener Gruppen von Akute Phase Proteinen, deren Expression spezifisch jeweils nur durch eines der Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  oder IL-6 induzierbar waren. Eine nachfolgende *in silico*-Analyse der Promoter dieser Gengruppen bestätigte die experimentell *in vitro* erhaltenen Hinweise auf die zentrale Rolle der Transkriptionsfaktoren der STAT-, C/EBP- und NF $\kappa$ B-Familie. Ferner unterstrich die Häufigkeit, mit der Bindungs-Motive der genannten Transkriptionsfaktoren in den Promotern der einzelnen Gene auftraten, die scharfe Definition der Gengruppen, die zuvor aufgrund experimentell ermittelter Expressionsprofile aufgestellt worden war.

Die zellulären Akute Phase Modelle, die im Laufe dieser Arbeit etabliert wurden, sind im Bezug auf die von diesen Zellen exprimierten Signaltransduktions-Komponenten weitreichend charakterisiert, so daß diese Systeme zur Testung chemischer Substanzen, die die CRP-Synthese modulieren oder inhibieren sollen, verwendet werden können. Insbesondere die Hep3B-Zelllinie stellt ein attraktives Modell zur Entschlüsselung der IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -induzierten Signaltransduktion dar, weil es in diesen Zellen zu keiner autokrinen IL-6-Produktion kommt und damit Einflüsse der JAK/STAT-Signaltransduktion keine Rolle spielen. Der generierte HepG2-Luciferase-Reportergen-Assay eignet sich durch eine ökonomische Durchführbarkeit mit geringem instrumentellem Aufwand zur Testung von chemischen Substanzbibliotheken im Hochdurchsatz-Verfahren.



**Abb.66 Das Zusammenspiel verschiedener Signaltransduktions-Kaskaden, die durch proinflammatorische Stimuli in Hepatozyten aktiviert werden.**(obere Darstellung)

unten: Die in vorliegender Arbeit angewendeten Mittel zur gezielten Inhibition einzelner Komponenten der Signaltransduktion sind in roter Farbe dargestellt. Die visualisierten Bezüge zwischen den einzelnen Rezeptoren, Adapterproteinen, Kinasen und Transkriptionsfaktoren sind literaturbasiert, bzw. beruhen auf neuen Erkenntnissen, die als Resultat experimenteller Befunde bei Bearbeitung vorliegender Dissertation gewonnen wurden.

## **6 Literaturverzeichnis**

- Agrawal, A.**, Cha-Molstad, H., Samols, D., Kushner, I. (2001)  
Transactivation of C-Reactive Protein by IL-6 Requires Synergistic Interaction of CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) and Rel p105  
*The Journal of Immunology*, **166**, 2378–2384
- Agrawal, A.**, Cha-Molstad, H., Samols, D., Kushner, I. (2003)  
Overexpressed nuclear factor- $\kappa$ B can participate in endogenous c-reactive protein induction, and enhances the effects of C/EBP $\beta$  and signal transducer and activator of transcription-3.  
*Immunology*, **108**, 539-547
- Akira, S.**, Isshiki, H., Sugita, H., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., Nakajima, T., Hirano, T., Kishimoto, T. (1990)  
A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family.  
*EMBO J.*, **9**, 1897-1906
- Alon, U.**, Barkai, N., Notterman, D.A., Gish, K., Ybarra, S., Mack, D., Levine, A.J. (1999)  
Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 6745-6750
- Anitschkow, N.** (1913)  
Über die Veränderungen der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose.  
*Beitr. Path. Anat.*, **56**, 379–404.
- Antonson, P.**, Xanthopoulos, K. G., (1995)  
Molecular cloning, sequence, and expression patterns of the human gene encoding CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ).  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **215** (1), 106-113
- Bass, B.L.** (2000)  
Double-stranded RNA as a template for gene silencing.  
*Cell*, **101**, 235-238
- Baumann, H.**, Gauldie, J. (1994)  
The acute phase response. *Immunology Today*, **15**, 74-80
- Bobik, A.**, Agrotis, A., Kanellakis, P., Dilley, R., Krushinsky, A., Smirnov, V., Tararak, E., Condrón, M., Kostolias, G., (1999)  
Distinct patterns of transforming growth factor- $\beta$  isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesion: colocalisation implicates TGF- $\beta$  in fibrofatty lesion development.  
*Circulation*, **99**, 2883-2891
- Boisvert, W.A.** (2004)  
Modulation of atherogenesis by chemokines. *Trends Cardiovasc. Med.*, **14**, 161-165

- Boring**, L., Gosling, J., Chensue, S.W., Kunkel, S.L. (1997)  
Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice.  
*J. Clin. Invest.*, **100** (10), 2552-2561
- Buck**, M., Poli, V., vander Geer, P., Chojkier, M., Hunter, T. (1999)  
Phosphorylation of rat serine 105 or mouse threonine 217 in C/EBP $\beta$  is required for hepatocyte proliferation induced by TGF  $\alpha$ . *Mol. Cell.*, **4**, 1087-1092
- Calabro**, P., Willerson, J.T., Yeh, E.T. (2003)  
Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation*, **108**, 1930-1932
- Calkhoven**, C.F., Geert, A.B., Wijnholds, J. (1992)  
cC/EBP, a chicken transcription factor of the leucine-zipper C/EBP family.  
*Nucleic Acids Res.*, **20**, 4093.
- Caplen**, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., Morgan, R. A. (2001)  
Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 9742-9747
- Cartharius**, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., Werner, T. (2005)  
MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites.  
*Bioinformatics*, **21**, 2933-2942
- Chang**, M.K., Binder, C.J., Torzewski, M., and Witztum, J.L. (2002)  
C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: phosphorylcholine of oxidized phospholipids.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 13043-13048
- Chung**, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., Shuai, K. (1997)  
Specific Inhibition of Stat3 Signal Transduction by PIAS3.  
*Science*, **278**, 1803-1805
- Cogoni**, C., Macino, G. (2000)  
Posttranscriptional gene silencing across kingdoms.  
*Curr. Opin. Genet. Dev.*, **10**, 638-643
- Cooper**, C., Henderson, A., Artandi, S., Avitahl, N., Calame, K. (1995)  
Ig/EBP (C/EBP $\gamma$ ) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family of transcriptional activators. *Nucl. Acid. Res.*, **23**, 4371-4377
- Danesh**, J., Wheeler, J.G., Hirschfield, G.M., Eda, S., Eiriksdotier, G., Rumley, A., Lowe, G.D., Pepys, M.B., Gudnason, V. (2004)  
C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.*, **350**, 1387-1397

- Darlington**, G. J., Ross, S. E., MacDougald, O. A. (1998)  
The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J.Biol.Chem.*, **273**, 30057-30060
- De Caterina**, R., Libby, P., Peng, H.B., Thannickal, V.J., Rajavashisth, T.B., Gimbrone, M.A., Shin, W.S., Liao, J.K., (1995)  
Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J. Clin. Invest.*, **96**(1), 60–68
- Eisen**, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D. (1998)  
Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 14863-14868.
- Elbashir**, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001)  
Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.*, **20**, 6877-6888
- Farrar**, W.L., Anderson, W.B. (1985)  
Interleukin-2 stimulates association of protein kinase C with plasma membrane. *Nature*, **315**, 233-235
- Fehsel**, K., Plewe D., Kolb-Bachofen, V. (1997)  
Nitric Oxide-Induced Expression of C-Reactive Protein in Islet Cells as a Very Early Marker for Islet Stress in the Rat Pancreas. *Nitric Oxide*, **1** (3),254-262
- Gabay**, C., Kushner, I., (1999)  
Acute-Phase Proteins and other Systemic Responses to inflammation. *New Engl. J. Med.*, **340**, 448-454
- Galis**, Z.S., Kathri, J.J. (2002)  
Matrix metalloproteinases in vascular remodelling and atherogenesis: the good, the bad and the ugly. *Circ.Res.*, **90**, 251-262
- Girdwood**, D., Tatham, M., Hay, R. (2004)  
SUMO and transcriptional regulation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **15**, 201-210
- Hack**, C.E., Wolbink, G.J., Schalkwijk, C., Speijer, H. (1997)  
A role of secretory phospholipase A2 and c-reactive protein in the removal of injured cells. *Immun. Today*, **18**, 111–115
- Hammond**, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., Hannon, G.J. (2001)  
Argonaute2, a link between genetic and biochemical analysis of RNAi. *Science*, **293**, 1146-1150
- Haruta**, H., Kato, A., Todokoro, K. (2001)  
Isolation of a novel Interleukin-1-inducible nuclear protein bearing ankyrin-repeat motifs. *J. Biol. Chem.*, **276**, 12485-12488

- Haverkate**, F., Thompson, S.G., Stephen, D.M.P., Gallimore, J.R., Pepys, M.B. (1997)  
Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina.  
European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group.  
*Lancet*, **349** (9050), 462-466
- Heid**, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. (1996)  
Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, **10**, 986-994
- Heim**, M.H, Kerr, I.M., Stark, G.R., Darnell, Jr, J.E. (1995)  
Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signalling by Jak-STAT pathway.  
*Science*, **267**, 1347-1349
- Heinrich**, P.C., Behrmann, I., Müller–Newen, G., Schaper, F., Graeve, L. (1998)  
IL-6-type cytokine signalling through the gp130/JAK/STAT pathway.  
*Biochem. J.* **334**, 297-314
- Hemann**, U., Gerhartz, C., Hesesel, B., Sassa, J., Kurapkat, G., Wollmer, A., Zhong, Z.,  
Darnell, Jr, J.E., Graeve, L. *et al.* Differential activation of acute phase response factor/Stat3  
and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src  
homology SH2 domains define the specificity of Stat factor activation.  
*J. Biol. Chem.*, **271**, 12999-13007
- Hirschfeld**, G.M., Gallimore, J.R., Kahan, M.C., Hutchinson, W.L., Sabin, C.A., Benson,  
G.M., Dhillon, A.P., Tennent, G.A., Pepys, M.B. (2005) Transgenic human c-reactive protein  
is not proatherogenic in apolipoprotein E-deficient mice.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8309-8314
- Huang**, T.T., Kudo, N., Yoshida, M., Miyamoto, S. (2000)  
A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I $\kappa$ B $\alpha$  controls cytoplasmic  
localization of inactive NF $\kappa$ B/ I $\kappa$ B $\alpha$  complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 1014-1019
- Jabs**, W.J., Theissing, E., Nitschke, M., Bechtel, J.F.M., Duchrow, M., Mohamed, S.,  
Jahrbeck, B., Sievers, H.-H., Steinhoff, J., Bartels, C. (2003)  
Local Generation of C-Reactive Protein in Diseased Coronary Artery Venous Bypass Grafts  
and Normal Vascular Tissue. *Circulation*, **108**, 1428-1431
- Kamizono**, S., Hanada, T., Yasukawa, H., Minoguchi, S., Kato, R., Minoguchi, M., Hattori,  
K., Hatakeyama, S., Yada, M., Morita, S., Kitamura, T., Kato, H. (2001)  
The SOCS Box of SOCS-1 Accelerates Ubiquitin-dependent Proteolysis of TEL-JAK2  
*J. Biol. Chem.*, , 12530 – 12538
- Kaptein**, A., Paillard, V. , Sander, M. (1996) Dominant Negative Stat3 Mutant Inhibits  
Interleukin-6-induced Jak-STAT Signal Transduction.  
*J. Biol. Chem.*, **271**, 5961-5964
- Kinoshita**, S., Akira, S., Kishimoto, T. (1992)  
A member of the C/EBP family, NF-IL6 $\beta$  forms a heterodimer and transcriptionally  
synergizes with NF-IL6.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 1473-1476

- Kitamura, H., Kanehira, K., Okita, K., Morimatsu, M., Saito, M. (2000)**  
MAIL, a novel nuclear I $\kappa$ B protein that potentiates LPS-induced IL-6 production.  
*FEBS Lett.*, **485**, 53-56
- Kitamura, H., Kanehira, K., Shiina, T., Morimatsu, M., Jung, B.D., Saito, M. (2002)**  
Bacterial lipopolysaccharide induces mRNA expression of I $\kappa$ B MAIL through Toll-like receptor 4.  
*J. Vet. Med. Sci.*, **64**, 419-422
- Kitamura, H., Matsushita, Y., Iwanaga, T., Mori, K., Kanehira, K., Fujikura, D., Morimatsu, M., Saito, M. (2003)**  
Bacterial lipopolysaccharide-induced expression of the I $\kappa$ B protein MAIL in B-lymphocytes and macrophages. *Arch. Histol. Cytol.*, **66** (1), 53-62
- Klein, C., Wüstefeld, T., Assmus, U., Roskams, T., Rose-John, S., Müller, M., Manns, M.P., Ernst, M., Trautwein, C., (2005).**  
The IL-6–gp130–STAT3 pathway in hepatocytes triggers liver protection in T cell–mediated liver injury. *J. Clin. Invest.*, **115**, 860–869
- Koenig, W., Sund, M., Froehlich, M., (1999)**  
C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation*, **99**, 237–242.
- Koj, A. (1985)** Definition and classification of acute-phase proteins. *The Acute Phase Response to Injury and Infection*. Elsevier, Amsterdam, 139 pp.
- Kwon, K.H., Murakami, A., Hayashi, R., Ohigashi, H. (2005)**  
Interleukin-1 $\beta$  targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18**, 647-654
- Kunjathoor, V.V., Febbraio, M., Podrez, E.A., Moore, K.J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J.S., Silverstein, R., Hoff, H.F., Freeman, M.W. (2002)**  
Scavenger Receptors Class A-I/II and CD36 Are the Principal Receptors Responsible for the Uptake of Modified Low Density Lipoprotein Leading to Lipid Loading in Macrophages. *J. Biol. Chem.*, **277**, (51), 49982-49988
- Lander, E.S., et al., (2001)**  
Initial sequencing and analysis of the human genome.  
*Nature*, **409**, 860-921
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L. (1988) (I)**  
The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, **240**, 1759-1764
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., Adashi, E.Y., Graves, B.J., McKnight, S.L. (1988) (II)**  
Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP.  
*Genes Dev.* **2** (7), 786–800

- LeClair**, K.P., Blanar, M. A., Sharp, P. A. (1992)  
The p50 subunit of NF $\kappa$ B associates with the NF-IL6 transcription factor.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 8145-8149
- Lee**, R.C., Ambros V. (2001)  
An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*  
*Science*, **294**, 862-864
- Lipschutz**, R. J., Fodor, S. P., Gingeras, T. R., Lockhart, D. J. (1999)  
High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat. Genet.*, **21**, 20-24
- Maekawa**, H., Tollefsen, D.M., (1996)  
Role of proposed serpin-enzyme complex receptor recognition sites in binding and internalisation of thrombin-heparin cofactor II complexes by hepatocytes.  
*J Biol. Chem.*, **271**, 18604-18609
- Manolov**, D.E., Roecker, C., Hombach, V., Nienhaus, G.U., Torzewski, J. (2004)  
Ultrasensitive confocal fluorescence microscopy of c-reactive protein interacting with Fc $\gamma$ RIIa. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 1-6
- Miyazawa**, K., Mori, A., Okudaira, H.  
Regulation of interleukin-1 $\beta$ -induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by glucocorticoids. *Journal of Biochemistry*, **124**, (6) 1130-1137
- Mold**, C., Nakayama, S., Holzer, T. J., Gwurz, H., Du Clos, T.W. (1981)  
C-reactive protein is protective against streptococcus pneumoniae infection in mice.  
*J. Exp. Med.*, **154**, 1703-1708
- Morley**, J.J., Kushner, I. (1982)  
Serum C-reactive protein levels in disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **389**, 406-418
- Mortensen**, R.F. (2001)  
C-reactive protein, inflammation and innate immunity. *Immunol Res.*, **24**, 163-176
- Moscat**, J., Diaz-Meco, M.T., Rennert, P. (2003)  
NF $\kappa$ B-activation by protein kinase C isoforms and B-cell function. *EMBO Rep.*, **4**, 31-36
- Motoyama**, M., Yamazaki, S., Eto-Kimura, A., Takeshige, K., Muta, T. (2004)  
Positive and negative regulation of nuclear factor- $\kappa$ B-mediated transcription by I $\kappa$ B- $\xi$ , an inducible nuclear protein. *J.B.C.*, **280**, 7444-7451
- O'Connell**, M. A., Cleere, R., Long, A., O'Neill, L. A. J., Kelleher, D., (1995)  
Cellular Proliferation and Activation of NF $\kappa$ B Are Induced by Autocrine Production of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in the Human T Lymphoma Line HuT 78.  
*J.B.C.*, **270**, 7399-7404
- Olivier**, E., Soury, E., Risler, J.L., Smih, F., Schneider, K., Lochner, K., (1999)  
A novel set of hepatic mRNAs preferentially expressed during acute inflammation in rat represents mostly intracellular proteins.  
*Genomics*, **57**, 352-3624



- Osawa, Y., Nagaki, M., Banno, Y., Brenner, D.A., Asano, T., Nozawa, Y., Moriwaki, H., Nakashima, S. (2002)**  
Tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 production via NF-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways inhibits cell apoptosis in human hepatocytes. *Infect. Immun.*, **70**, 6294–6301
- Pasceri, V., Willerson, J.T., Yeh, E.T.H (2000)**  
Direct proinflammatory effect of c-reactive Protein on human endothelial cells. *Circulation*, **102**, 2165-2168
- Pasceri, V., Chang, J., Willerson, J.T., Yeh, E.T.H (2001)**  
Modulation of c-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation*, **103**, 2531-2534
- Paul, A., Ko, W.S., Li, L., Yechoor, V., McCrory, M.A., Szalai, A.J., Chan, L., (2004)**  
C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, **109**, 647-655
- Pearson, T.A., Mensah, G.A., Alexander, R.W., Anderson, J. L., Cannon, R.O., Criqui, M., Fadl, Y.Y., Fortmann, S.P., Hong, Y., Myers G.L., Rifai, N., Smith, S.C., K., Taubert, Tracy, R.P., Vinicor, F. (2003)**  
Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*, **107**, 499-511
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., Werner, T. (1995)**  
MatInd and MatInspector: new and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acid Research*, **23**, 4878-4884
- Ramji, D. P., Foka, P. (2002)**  
CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function und regulation. *Biochem J.*, **365**, 561-575
- Ramji, D.P., Vitelli, A., Tronche, F., Cortese, R., Ciliberto, G. (1992)**  
The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/NF-IL6 and C/EBP $\delta$ /NF-IL6 $\beta$ , are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms. *Nucleic Acid Research*, **21**, 289-294
- Ray, A., Ray, B.K. (1994)**  
Serum amyloid A gene expression under acute-phase conditions involves participation of inducible C/EBP-beta and C/EBP-delta and their activation by phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 4324-4332
- Ridger, P.M., Hennekens, C.H., Buring, J.E., Rifai, N., (2000)**  
C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N. Engl. J. Med.*, **342**, 836-843
- Ritzeler, O., Stilz, U., Neises, B., Jaehne, G., Habermann, J. (2000)**  
Benzimidazoles. German Patent No. DE19928424-A1; 2000.

- Rogers, R. S., Horvath, C. M., Matunis, M. J. (2003)**  
SUMO Modification of STAT1 and Its Role in PIAS-mediated Inhibition of Gene Activation  
*J. Biol. Chem.*, **278**, 30091 – 30097
- Ross, R. (1999)**  
Atherosclerosis: an inflammatory disease.  
*N. Engl. J. Med.*, **340**, 115-126
- Ruminy, P., Gangneux, C., Claeysens, S., Scorre, M., Daveau, M., Salier, J.-P. (2001)**  
Gene transcription in hepatocytes during the acute phase of a systemic inflammation: from transcription factors to target genes. *Inflamm. Res.*, **50**, 383-390
- Sherlock, G. (2000)** Analysis of large-scale gene expression data.  
*Current Opinion in Immunology*, **12**, 201-205.
- Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P. C., Schaper, F., (2000)**  
SOCS3 Exerts Its Inhibitory Function on Interleukin-6 Signal Transduction through the SHP2 Recruitment Site of gp130. *J. Biol. Chem.*, **275**, 12848 – 12856
- Smith, J.D., Trogan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J., Miyata, M. (1995)**  
Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 8264-8268
- Stahl, N., Boulton, T.G., Farrugella, T., Ip, N.Y., Davis, S., Witthuhn, B.A., Quell, F.W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S. (1994)**  
Association and Activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 $\beta$  receptor Komponenten. *Science*, **263**, 92-95
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R. Silvermann, R.H., Schreiber, R.D. (1998)**  
How cells respond to interferons.  
*Annu. Rev. Biochem.*, **97**, 227-264
- Su, T.T., Guo, B., Kawakami, Y., Sommer, K., Chae, K., Humphries, L.A., Kato, R.M. et al. (2002)** PKC- $\beta$  controls I $\kappa$ B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling. *Nat. Immunol.*, **3**, 780-786
- Sukhova, G.K., Shi, G.P., Simion, D.I., Chapman, H.A., Libby, P. (1998)**  
Expression of the elastolytic cathepsin S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, **102**, 576-583
- Sun, C., Summers, C., Raizada, M.K. (2002)**  
Chronotropic action of angiotensin II in neurons via protein kinase C and CaMKII.  
*Hypertension.*, **39**, 562-566.
- Szalai, A.J., Briles, D.E., Volanakis, J.E. (1995)**  
Human C-reactive protein is protective against fatal *Streptococcus pneumoniae* infection in transgenic mice. *J. Immunol.*, **155**, 2557–2563.
- Takaoka, Y., Niwa, S., Nagai, H. (1999).**  
Interleukin-1 $\beta$  induces interleukin-6 production through the production of prostaglandin E(2) in human osteoblasts, MG-63 cells. *Biochem. (Tokyo)*. **126**(3), 553-558

- Taylor**, K.E., Giddings, J.C., van der Berg, C.W. (2004) C-reactive protein-induced in vitro endothelial cell activation is an artefact caused by azide and lipopolysaccharide. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 1-6
- Thompson**, J.E., Cubbon, R.M., Cummings, R.T., Wicker, L.S., Frankshun, R., Cunningham, B.R., Cameron, P.M., Meinke, P.T., Liverton, N., Weng, Y., DeMartino, J.A. (2002) Photochemical preparation of a pyridone containing tetracycle: A JAK protein kinase Inhibitor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry letters*, **12**, 1219-1223
- Tillett**, W.S., Francis, T. (1930)  
Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *The Journal of Experimental Medicine*, **52**, 561-571
- Timchenko**, N. A., Harris, T. E., Wilde, M., Bilyeu, T. A. Burgess-Beusse, B. L., Finegold, M. J., Darlington, G. J. (1997)  
CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 7353-7361
- Trautwein**, C., Caelles, C., van der Geer, P., Hunter, T., Karin, M., Chojkier, M. (1993)  
Transactivation by NF-IL-6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. *Nature*, **364**, 544-547
- Venter**, J.C., *et al.*, (2001)  
The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304-1351
- Vinson**, C. R., Sigler, P. B., McKnight, S. L. (1989)  
Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*, **246**, 911-916
- Virmani**, R., Kolodgie, F.D., Burke, A.P. Farb, A., Schwartz, S.M. (2000)  
*Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 1262-1275
- Volanakis**, J.E. (1982)  
Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1982, **389**, 235-250
- Wang**, N. D., Finegold, M. J., Bradley, A., Ou, C. N., Abdelsayed, S. V., Wilde, M. D., Taylor, L. R., Darlington, G. J. (1995)  
Impaired energy homeostasis in C/EBP $\alpha$  knockout mice. *Science*, **269**, 1108-1112
- Weissberg**, P.L., (2000) Atherogenesis: current understanding of the causes of atheroma. *Heart*, **83**, 247
- Wigmore**, S.J., Fearon, K.C., Maingay, J.P., Lai, P.B., Ross, J.A. (1997)  
Interleukin-8 can mediate acute-phase protein production by isolated human hepatocytes. *Am. J. Physiol.*, **273**, 720-726
- Willerson**, J.T., Kereiakes, D.J. (2003)  
Endothelial Dysfunktion

*Circulation*, **108**, 2060-2061

**Williams**, S.C., Baer, M., Dillner, A.J., Johnson, P.F., (1995)

CRP2 (C/EBP $\beta$ ) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *EMBO J.*, **14**, 3170-3183

**Xanthopoulos**, K.G., Mirkovitch, J., Decker, T., Kuo, C. F., Darnell, J. E. (1989)

Cell-Specific Transcriptional Control of the Mouse DNA-Binding Protein mC/EBP  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 4117-4121

**Xiao**, G., Harhaj, E.W., Sun, S.C. (2004)

NF $\kappa$ B-inducing kinase regulates the processing of NF $\kappa$ B2 p100.  
*Mol. Cell.*, **7**, 401-409

**Yamamoto**, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeuchi, O., Takeshige, K. Saitoh, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Yamamoto, S., Muta, T., Takeda, K., Akira, S. (2004)

Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I $\kappa$ B- $\xi$ . *Nature*, **430**, 218-222

**Yamazaki**, S., Muta, T., Takeshige, K. (2001)

A novel I $\kappa$ B protein, I $\kappa$ B- $\xi$ , induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor  $\kappa$ B in the nuclei. *J. Biol. Chem.*, **276**, 27657-27662

**Zhang**, Y., Turkson, J., Carter-Su, C., Smithgall, T., Levitzki, A., Kraker, A., Krolewski, J.J., Medveczky, P., Jovea, R., (2000)

Activation of Stat3 in v-Src-transformed Fibroblasts Requires Cooperation of Jak1 Kinase Activity. *J. Biol. Chem.*, **275**, 24935-24944

**Zwaka**, T.P., Hombach, V., Torzewski, J. (2001)

C-reactive protein-mediated Low Density Lipoprotein uptake by macrophages.  
*Circulation*, **103**, 1194-1197

## **7 Anhang**

### **Veröffentlichungen**

#### **Originalpublikationen**

Yuri Ivashchenko\*, Frank Kramer\*, Stefan Schäfer, Andrea Bucher, Kerstin Veit, Vinzenz Hombach, Andreas E. Busch, Olaf Ritzeler, Jürgen Dedio, Jan Torzewski

#### **Protein Kinase C Pathway is involved in Transcriptional Regulation of C-reactive Protein Synthesis in Human Hepatocytes**

*Atheroscler, Thromb Vasc Biol.* 2005; **25**:186-192

\* both authors contributed equally to this work

Frank Kramer, Jan Torzewski, Vinzenz Hombach, Andreas Busch, Stefan Schäfer, Jürgen Dedio, Yuri Ivashchenko

#### **Interleukin-1 $\beta$ regulates acute phase response in primary human hepatocytes by inducing an autocrine Interleukin-6 loop**

Januar 2006, Manuskript in Vorbereitung

Frank Kramer

#### **Bluthochdruck / Hypertonie**

Informationsbroschüre des Landesapothekerverbandes Baden-Württemberg 2005,  
LAV-SOFO-Markt 05/05

Frank Kramer, Anne Kramer

#### **Tinnitus**

Informationsbroschüre des Landesapothekerverbandes Baden-Württemberg 2005,  
LAV-SOFO-Markt 07/05

## **Kongressbeiträge**

Y. Ivashchenko, F. Kramer, S. Schaefer, A. Bucher, K. Veit, V. Hombach, A. Busch, O. Ritzeler, J. Dedio, J. Torzewski

**The protein kinase C-pathway is involved in transcriptional regulation of C-reactive protein synthesis in human hepatocytes.**

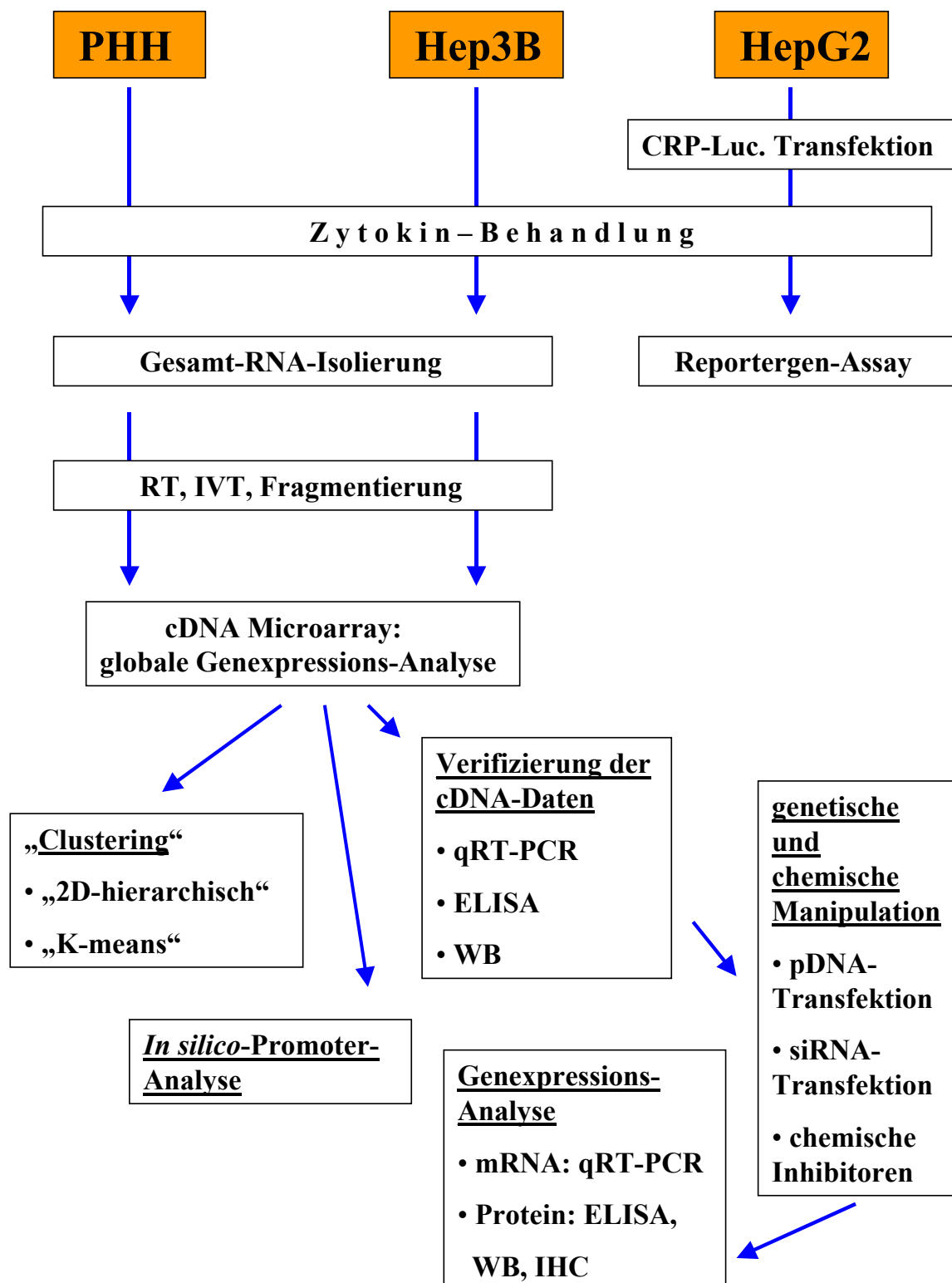
Freier Vortrag: 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V.; Z Kardiol 94: Suppl 1 (2005)

Y. Ivashchenko, J. Torzewski, F. Kramer, A. Bucher, K. Veit, V. Hombach, O. Ritzeler, A. E. Busch, S. Schäfer.

**Targeting c-reactive protein: A novel model for studying its synthesis and a novel key pathway of its transcriptional regulation in human hepatocytes.**

Posterpräsentation beim jährlichen Treffen der „American Heart Association“ 2004 in New Orleans

## Methodische Vorgehensweise bei der Durchführung der Dissertation:



## **Danksagung**

Die vorliegende Dissertation wurde als externe Doktorarbeit in der Abteilung Cardiovascular Diseases der Sanofi-Aventis Deutschland GmbH in Frankfurt am Main unter der Anleitung von Prof. Dr. Andreas E. Busch angefertigt.

Mein aufrichtiger Dank gilt:

Herrn Dr. Yuri Ivashchenko für die intensive fachliche Betreuung und die freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Andreas E. Busch für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Bereitstellung eines kreativen Arbeitsumfeldes und die Betreuung des Dissertationsprojektes.

Herrn Prof. Dr. Theodor Dingermann, der als Vertreter der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main meine Arbeit als wissenschaftlicher Gutachter betreut und freundlich unterstützt hat.

Herrn PD. Dr. Jürgen Dedio für seine konstruktiven Ratschläge bei inhaltlichen und formellen Fragen, sowie für seine immerwährende aufrichtige Unterstützung im Laboralltag.

Herrn PD. Dr. Jan Torzewski für die spannende und kreative Zusammenarbeit und seine stets gewährte Gastfreundschaft.

Allen Kollegen des Labors Ivashchenko, sowie der TD Cardiovascular für die freundliche Aufnahme und die gute Zusammenarbeit.

Katja Hürland für ihre Freundschaft und ihre erfrischend andere Sicht der Dinge.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn DI Matthias Ozog, der nicht nur mit unerschöpflichem fachlichen Rat insbesondere zum Thema qRT-PCR und siRNA-Technologie meine Arbeit begleitete und mit konstruktiven Diskussionen zum Gelingen des Projektes beitrug, sondern auch durch persönliche Ratschläge in allen Lebenslagen zum wertvollen Freund wurde.

Meiner Frau Anne, die, obwohl sie häufig ungerechtfertigterweise zu kurz kam, mich stets liebevoll unterstützte und mir den Rücken freihielt.



## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

<b>Vor-und Nachname:</b>	Frank Kramer
<b>Wohnhaft:</b>	Wuppertal
<b>geboren am:</b>	09. Dezember 1974
<b>Geburtsort:</b>	Sendenhorst
<b>Nationalität:</b>	deutsch

### Ausbildungsdaten:

<b>Juni 2003 – Dezember 2005:</b>	Bearbeitung vorliegender Dissertation in der Abteilung „Cardiovascular Diseases“ bei der Sanofi-Aventis-Deutschland GmbH, Frankfurt am Main unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Andreas E. Busch und Herrn Prof. Dr. Theodor Dingermann
<b>Dezember 2003:</b>	Approbation zum Apotheker
<b>November 2002 – Mai 2003:</b>	Tätigkeit als Pharmazie-Praktikant in der Konstabler-Apotheke, Frankfurt am Main
<b>Oktober 2002 – November 2002:</b>	Absolvieren eines Englischkurses am Cape-Communication-Centre, Kapstadt, Südafrika
<b>Oktober 1998 – Oktober 2002:</b>	Studium der Pharmazie am Biozentrum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main

- September 1995 – Mai 1998:** Ausbildung zum Chemielaboranten bei der WYETH-Pharma-GmbH, Münster
- Juli 1994 – Juli 1995:** Ableistung des Grundwehrdienstes
- August 1985 – Juni 1994:** Besuch des St. Michael-Gymnasiums, Ahlen in Westfalen,  
Erreichen der allgemeinen Hochschulreife
- August 1981 – Juni 1985:** Besuch der Kardinal-von-Galen-Grundschule, Sendenhorst

**Praktische Tätigkeiten :**

- August 1999 - September 1999:** Befristete Anstellung als Chemielaborant zur Stabilitätsprüfung von Fertigarzneimitteln bei WYETH-MEDICA-IRELAND, Newbridge Co. Kildare, Irland
- Juni 1998 – September 1998:** Anstellung als Chemielaborant in der Qualitätskontrollabteilung der WYETH-Pharma-GmbH, Münster

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Frank Kramer, geboren am 09.12.1974 in Sendenhorst, daß ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Molekulare Mechanismen der Akute Phase Reaktion: Transkriptionelle Regulation des C-reaktiven Proteins“ selbständig angefertigt und keine anderen Quellen oder Hilfsmittel als die hier angegeben benutzt habe. Ich habe bisher an keiner anderen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Wuppertal, den 10.02.2006