

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR  
Kinder- und Jugendmedizin  
Prof. Dr. Michael Melter  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS DES LEBERREGENERATION  
ASSOZIIERTEN PROTEINS ALR AUF DIE INFLAMMATORISCHE REAKTION DER  
LEBER: ANALYSE VON AKUTPHASEPROTEINEN

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Leonhard Bürger

2018



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR  
Kinder- und Jugendmedizin  
Prof. Dr. Michael Melter  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS DES LEBERREGENERATION  
ASSOZIIERTEN PROTEINS ALR AUF DIE INFLAMMATORISCHE REAKTION DER  
LEBER: ANALYSE VON AKUTPHASEPROTEINEN

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Leonhard Bürger

2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Weiß
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Christa Büchler
Tag der mündlichen Prüfung:	17.04.2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	7
1.1 <i>Die Leber</i>	7
1.2 <i>ALR - Augmenter of liver regeneration</i>	9
1.2.1 Geschichtlicher Überblick	9
1.2.2 Das menschliche ALR-Gen und -Protein	10
1.2.3 Funktionen und Aufgaben	12
1.2.3.1 Wirkmechanismen	12
1.2.3.2 Intrazelluläre Aufgaben	13
1.2.3.3 Extrazelluläre Aufgaben	14
1.3 <i>Leberregeneration und Betrachtung der Rolle des Proteins ALR</i>	15
1.3.1 Molekulare Mechanismen der Leberregeneration	16
1.3.2 Die Rolle von ALR im Rahmen der Regeneration	16
1.4 <i>Die Akut-Phase-Reaktion</i>	17
1.4.1 Auslösung und Ablauf einer Akut-Phase-Reaktion	17
1.4.2 Interleukin 6 und seine Bedeutung bei der Akut-Phase-Reaktion	19
1.4.2.1 Strukturelle Betrachtung von Interleukin 6	19
1.4.2.2 Die Signaltransduktion von IL-6	19
1.4.3 IL-6-Signal-Regulation	21
1.4.4 Interleukin 1( $\beta$ ) und seine Bedeutung in der Akut-Phase-Reaktion	22
1.4.5 Überblick über die in der Arbeit untersuchten Akut-Phase-Proteine	23
1.4.5.1 Ein allgemeiner Überblick über die APPs und deren Gruppierung	23
1.4.5.2 Antithrombin (III)	25
1.4.5.3 Fibrinogen $\beta$	25
1.4.5.4 Haptoglobin	26
1.4.5.5 Serum Amyloid A 2	27
1.5 <i>Fragestellung der Dissertation</i>	29
<b>2. Materialien und Methoden</b>	31
2.1 <i>Materialien</i>	31
2.1.1 Geräte und Softwares	31

2.1.2 Verbrauchsmaterialien	32
2.1.3 Reagenzien	32
2.1.4 Analyse-Kit-Systeme	34
2.1.5 Zelllinien	34
2.1.6 Primer	34
2.1.7 Antikörper	36
2.1.8 Puffer und Lösungen	36
2.1.8.1 Zellernte	36
2.1.8.2 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	37
2.1.8.3 ELISA	38
<b>2.2 Methoden</b>	<b>38</b>
2.2.1 Zellkultur	38
2.2.1.1 Verwendete Zelllinien	38
2.2.1.2 Subkultivieren und Aussäen der Zellen	39
2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl	39
2.2.1.4 Stimulation und Zellernte	39
2.2.2 RNA-Isolation	40
2.2.3 Reverse Transkription der isolierten RNA	41
2.2.4 RT-PCR	41
2.2.5 Statistische Analyse der RT-PCR-Ergebnisse	42
2.2.6 Protein-Isolation	42
2.2.7 BCA-Test zur Proteinkonzentrationsbestimmung	42
2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
2.2.9 Western Blot	43
2.2.10 Statistische Analyse der Western Blot Ergebnisse	44
2.2.11 Gewinnung der Zellkultur-Überstände für die Vermessung mittels ELISA	44
2.2.12 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA	44
<b>3. Darstellung der eigenen Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1 Etablierung des IL-6- bzw. LPS-Zellkulturmodells	46
3.1.1 Etablierung des epithelialen Zellkulturmodells	46
3.1.2 Etablierung des monozytären Zellkulturmodells	47

<b>3.2 Untersuchungen im monozytären Zellkulturmodell</b>	<b>48</b>
3.2.1 Zeitabhängigkeit der Zytokin-Expression	48
3.2.2 Kontrolle der Ergebnisse der Zytokin-Stimulation - Ausschluss von LPS-Kontamination des rekombinanten Proteins	50
3.2.3 Inhibition spezifischer Signalwege in RAW-Zellen zur Untersuchung eines potentiellen Wirkmechanismus von ALR	54
<b>3.3 Untersuchungen im epithelialen Zellkulturmodell</b>	<b>56</b>
3.3.1 Zeitabhängigkeit der APP-Expression und des Einflusses von ALR	56
3.3.2 Änderung der APP-mRNA-Expression in Abhängigkeit der ALR-Konzentration	58
3.3.3 Einfluss von intrazellulärem ALRp auf die APP-mRNA-Expression	60
3.3.4 Auswirkungen der Inhibition einzelner Signalkaskaden auf die APP-Expressions-Reduktion von ALRp	62
3.3.4.1 Einsatz verschiedener Inhibitoren	62
3.3.4.2 Überprüfung der Wirkung von PD98059 auf die IL-6- bzw. ALR-Signalkaskade	66
3.3.5 Untersuchung des Einflusses auf die STAT3-Phosphorylierung durch ALR	67
3.3.6 Die Bedeutung des intrazellulären ALR für die STAT3-Phosphorylierung und -Dimerisierung	69
3.3.7 Der Einfluss von ALR auf die APP-Freisetzung - Proteinbestimmung im Zellkulturüberstand	71
3.3.7.1 Die Wirkung von ALRp auf die APP-Produktion in HepG2-Zellen	71
3.3.7.2 Vergleich zwischen sfALR-HepG2- und HepG2-Zellen	73
<b>4. Diskussion</b>	<b>74</b>
4.1 Einfluss von ALRp auf die Zelllinie RAW	74
4.2 Einfluss von ALRp auf die APP-Expression in HepG2	76
4.2.1 Wirkung und Signaltransduktion von extrazellulärem ALRp bzgl. seines Einflusses auf die Änderung der APP-Expression und Vergleich mit anderen Wachstumsfaktoren der Leber	77
4.2.2 Intrazelluläres ALRp und seine Wirkung auf die APP-Expression	79

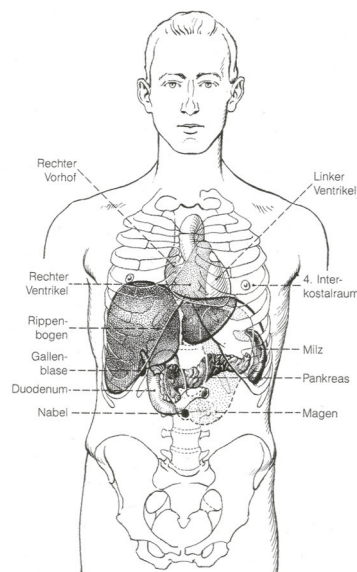
<i>4.3 Bedeutung der beobachteten Auswirkung von ALRp für die Leberregeneration</i>	80
<i>4.4 Klinische Bedeutung der Wirkung von ALRp</i>	84
<b>5. Zusammenfassung</b>	86
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	88
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	102
<b>8. Abbildungsverzeichnis</b>	105
<b>9. Tabellenverzeichnis</b>	107
<b>10. Danksagungen</b>	108
<b>11. Lebenslauf</b>	109
<b>12. Erklärung</b>	110
<b>13. Publikationen</b>	111

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Leber

Die Leber ist eines der wichtigsten Stoffwechselorgane im menschlichen Körper. Sie erfüllt zahlreiche zentrale Aufgaben im Organismus, welche sich nicht nur auf die reine Verdauungsfunktion beschränken (Gekle 2010). So ist die Leber nicht nur essentieller Bestandteil des Verdauungstraktes, sondern erfüllt auch andere, wichtige Funktionen, wie zum Beispiel die Speicherung von Glykogen, Vitaminen und Spurenelementen, die Biotransformation von Endobiotica und Xenobiotica und die Synthese von zahlreichen Proteinen (Häussinger 2007; Schirmacher 2012). Deswegen ist es verständlich, dass die vielseitigen Erkrankungen der Leber ein breites klinisches Symptom-Spektrum besitzen (Brüning 2013; Schirmacher 2012) und man bereits in der Antike das Regenerationspotential und die Notwendigkeit der Leber für den menschlichen Organismus kannte (Leven 2005).

Aus anatomischer Sicht ist die Leber (griechisch "Hepar") ein unpaares Organ, welches sich im rechten Oberbauch befindet (s. Abbildung 1) und in gesundem Zustand ca. 1500 g wiegt. Ihre Lage ist intraperitoneal und sie wird in zwei Lappen und acht Segmente unterteilt. Es gibt einen Teil der Leber, welcher mit dem Zwerchfell verwachsen ist. Dieser wird auch Area nuda genannt, da er nicht vom Peritoneum bedeckt ist (Drenckhahn 2008).



**Abbildung 1:** Menschlicher Oberbauch-Situs. In diesem Überblick über den Oberbauch-Situs erkennt man die Ausdehnung der Leber und ihre Lagebeziehung zu anderen Organen. Sie liegt dem Zwerchfell direkt an und erstreckt sich bis in den linken Oberbauch (Drenckhahn 2008).

Blutzufuhr erhält das Organ über die Leberarterien aus der Aorta und die Portalvene, welche das nährstoffreiche Blut des Verdauungstraktes zum Zentrum des humanen Stoffwechsels führt (Drenckhahn 2008).

Mikroskopisch gliedert sich die Leber in Läppchen, deren Hauptmasse aus epithelialen Hepatozyten besteht (s. Abbildung 2). Die Pfortader verzweigt sich in ihr in Sinusoide. Deren Epithel ist zahlreich fenestriert, durch welches das nährstoffreiche Blut aus der Pfortader mit den Hepatozyten in Kontakt tritt und somit für deren Stoffwechselleistung verfügbar gemacht wird. Über die Gallengänge wird die von den Hepatozyten sezernierte Gallenflüssigkeit aus der Leber Richtung Darm befördert. Sie enthält einerseits verdauungsfördernde beziehungsweise -nötige Substanzen, andererseits auch Ausscheidungsprodukte. Zentral in den Läppchen befindet sich die sogenannte Zentralvene, welche das Blut Richtung Herz dann wieder abtransportiert. So gibt es also in der Leber zwei Flussrichtungen. Das Blut der Pfortader verläuft zum Hepatozyten und dann über die Zentralvene in den systemischen Kreislauf, die Gallenflüssigkeit läuft vom Hepatozyten weg zum Darm (Welsch 2010).

In der Leber befinden sich aber auch noch weitere, organspezifische Zellen. Die Kupffer-Zellen, benannt nach Karl von Kupffer, sind Makrophagen des monozytären Phagozytensystems, stehen im Dienste der Immunabwehr und sind mit den Epithelzellen durch lose Zell-Kontakte verbunden. Neben ihnen gibt es auch die sogenannten ITO-Zellen, welche auch Fettspeicherzellen, Sternzellen oder perisinusoidale Zellen genannt werden. Ihnen kommt als spezielle Fibroblasten vor allem bei der Bindegewebsbildung, welche für die Entwicklung einer Leberzirrhose verantwortlich ist, sowie bei der Fett- und Vitamin-A-Speicherung eine entscheidende Bedeutung zu (Drenckhahn 2008; Leven 2005; Schirmacher 2012; Schünke 2009; Welsch 2010).



**Abbildung 2:** Histologie der Leber. Eine zeichnerische Darstellung der Leberhistologie zeigt die Läppchen-Gliederung mit der mittig liegenden Zentralvene und den periportalen Feldern, in welchen sich die zuführenden bzw. abführenden Gefäße befinden, welche auch als Glisson-Trias bezeichnet werden - bestehend aus Gallengang, Arterie und Vene (Welsch 2010).

## 1.2 ALR - Augmenter of liver regeneration

### 1.2.1 Geschichtlicher Überblick

Bereits 1931 untersuchte man die Regenerationsfähigkeit der Leber wissenschaftlich (Higgins 1931) und in den Jahren danach wurden etliche Wachstumsfaktoren identifiziert. 1975 entdeckte man eine als HSS, "*hepatocyte stimulatory substance*", benannte Fraktion mit das Leberwachstum unterstützender Funktion (LaBrecque 1975). Durch weitere Fraktionierung und Durchführung einer SDS-Polyacrylamidgel-

elektrophorese beobachtete man, dass HSS zwei Banden bildet; eine stärkere 17,5 kDa-, und eine schwächere 12,4 kDa-Bande (LaBrecque 1987). Daraufhin gelang es Francavilla, ein Protein aus der HSS-Fraktion mit einer Molekularmasse von 30 kDa aufzureinigen und zu sequenzieren. Es erhielt den Namen ALR - "*augmenter of liver regeneration*", da eine wesentliche Funktion dieses Proteins die Förderung der Leberregeneration darstellt (Francavilla 1987; Francavilla 1991; Francavilla 1994). In den folgenden Jahren wurden vermehrt Untersuchungen zu Eigenschaften und Struktur angestellt. Es gelang auch das Gen zu klonieren (Giorda 1996; Hagiya 1994; Hagiya 1995).

Trotz zahlreicher Studien sind bis heute aber bei Weitem noch nicht alle Eigenschaften untersucht worden, auch ist die Rolle des Proteins in der Physiologie und Pathophysiologie der Leber noch nicht vollständig verstanden.

### **1.2.2 Das menschliche ALR-Gen und -Protein**

Das menschliche ALR-Gen befindet sich auf Chromosom 16. Es ist in der sogenannten PKD1-Region lokalisiert und besteht aus drei Exons und zwei Introns (Cheng 2000; Lisowsky 1995; Lu 2002b).

Bisher sind drei Isoformen von ALR beschrieben. Das längste ALR-Transkript besitzt eine Länge von 205 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 23 kDa; Es wird auch als "*long form ALR*" bezeichnet. Neben diesem längsten Transkript gibt es auch eines mit einem Molekulargewicht von 21 kDa. Die dritte Isoform ist ein kleineres, 125 Aminosäuren langes Transkript, welches ein Gewicht von 15 kDa besitzt und um 80 Aminosäuren am N-Terminus kürzer ist als lfALR; Dieses wird auch als "*short form ALR*" bezeichnet (Cheng 2000; Dayoub 2011; Gandhi 2012; Lu 2002b). Die Formen sind in der Lage gegenseitig zu dimerisieren (Wu 2003).

Strukturell gesehen ist das ALRp ein kegelförmiges Helix-Bündel, welches aus mehreren  $\alpha$ -Helices besteht. Im Mund des Kegels befindet sich ein gebundenes FAD-Molekül. Die oben bereits erwähnte Dimerisierung kommt durch intermolekulare Disulfidbrücken, aber auch durch hydrophobe Interaktionen zustande (Li 2002; Wu 2003).

Die in ALR vorhandenen Disulfidbrücken besitzen jedoch nicht nur strukturelle Aufgaben, sondern könnten auch eine Funktion des Proteins als Sulfhydryl-Oxidase, Aktivator von Transkriptionsfaktoren oder eine Beziehung zur Atmungskette ermöglichen (Farrell 2005). Dazu besitzt es ein CXXC-Motiv, also Trennung zweier Cysteine

durch zwei weitere Aminosäuren (Wu 2003).

In Abbildung 3 sieht man das Strukturmodell des 15 kDa großen ALR.

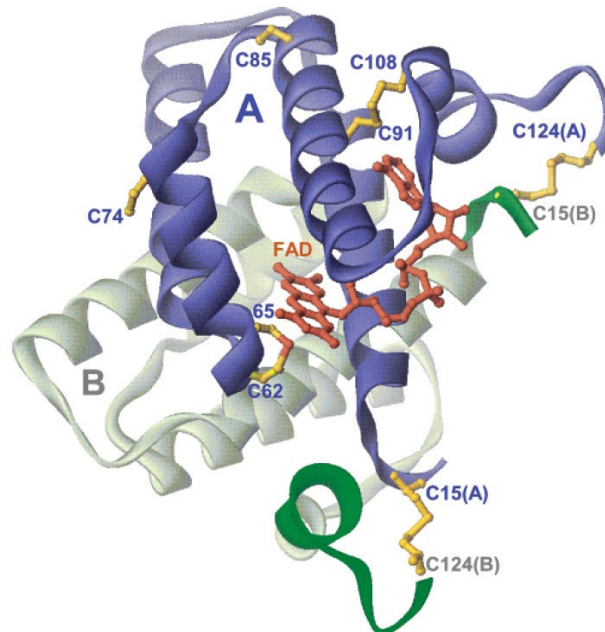


Abbildung 3: Die ALR-Protein-Struktur. Gezeigt ist das Ribbon-Homologie-Modell des humanen short form ALRp, welches basierend auf der Kristallstruktur des Ratten-ALR erstellt wurde. Dies ist wegen einer 86%-igen Homologie möglich. Die Untereinheit A ist in blau, die Untereinheit B in grau dargestellt (C- und N-Termini sind in grün hervorgehoben). Die Cystein-Reste sind nummeriert und gelb, das FAD-Molekül ist orange dargestellt (Farrell 2005).

Jedoch findet sich auch in anderen Organismen ein homologes Protein zum menschlichen ALRp. So besitzen zum Beispiel Maus oder Ratte ein Protein mit über 70%iger Homologie zum menschlichen ALRp (Dayoub 2009). Nicht nur in anderen Säugetieren, sondern auch in der Hefe, *Saccharomyces cerevisiae*, existiert ein homologes Protein. Hier wird es ERV1 ("Essential for Respiration and Viability") genannt und besitzt zu 50% Homologie zum ALRp der Ratte (Hagiya 1994; Lisowsky 1995). Diese starke Homologie erlaubt es, Parallelen aus den Kenntnissen anderer Organismen auf den Menschen zu ziehen.

Betrachtet man die Expression des Proteins in Säugetieren, so kann man es in mehreren Organen nachweisen. Neben der Leber ist ALR unter anderem auch im Gehirn, Cerebellum, Herz, in der Niere oder dem Hoden nachweisbar (Giorda 1996; Hagiya 1994; Klissenbauer 2002). Intrazellulär ist lfALR im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert (Lange 2001), Isoformen des Proteins wurden auch im Zytosol und im Zellkern gefunden, wie sie ebenso vom Hepatozyten sezerniert werden und im Serum nachweisbar sind (Gandhi 1999). Aufgrund der Sezernierung des Proteins kann man zwischen intra- und extrazellulären Funktionen unterscheiden.

Die Expression von ALR wird von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Zytokine, wie IL-1 oder IL-6, steigern die mRNA-Expression von ALR nach 24 h Inkubation in Leberzellen. Wachstumsfaktoren und co-mitogene Substanzen, zum Beispiel HGF, EGF, PDGF, zeigen hingegen keinen Effekt auf die mRNA-Expression von ALR (Dayoub 2009).

In einem Nierenzellmodell gab es auch Hinweise, dass das intra- und das extrazelluläre ALRp in gegenseitiger Regulation miteinander in Verbindung stehen (Yan 2015b).

Auch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie FOXA2/HNF3 $\beta$  oder Nrf2, mit Einfluss auf die ALR-Expression konnten identifiziert werden, IL-6 scheint diese Wirkung zu verstärken (Dayoub 2010; Dayoub 2013).

### **1.2.3 Funktionen und Aufgaben**

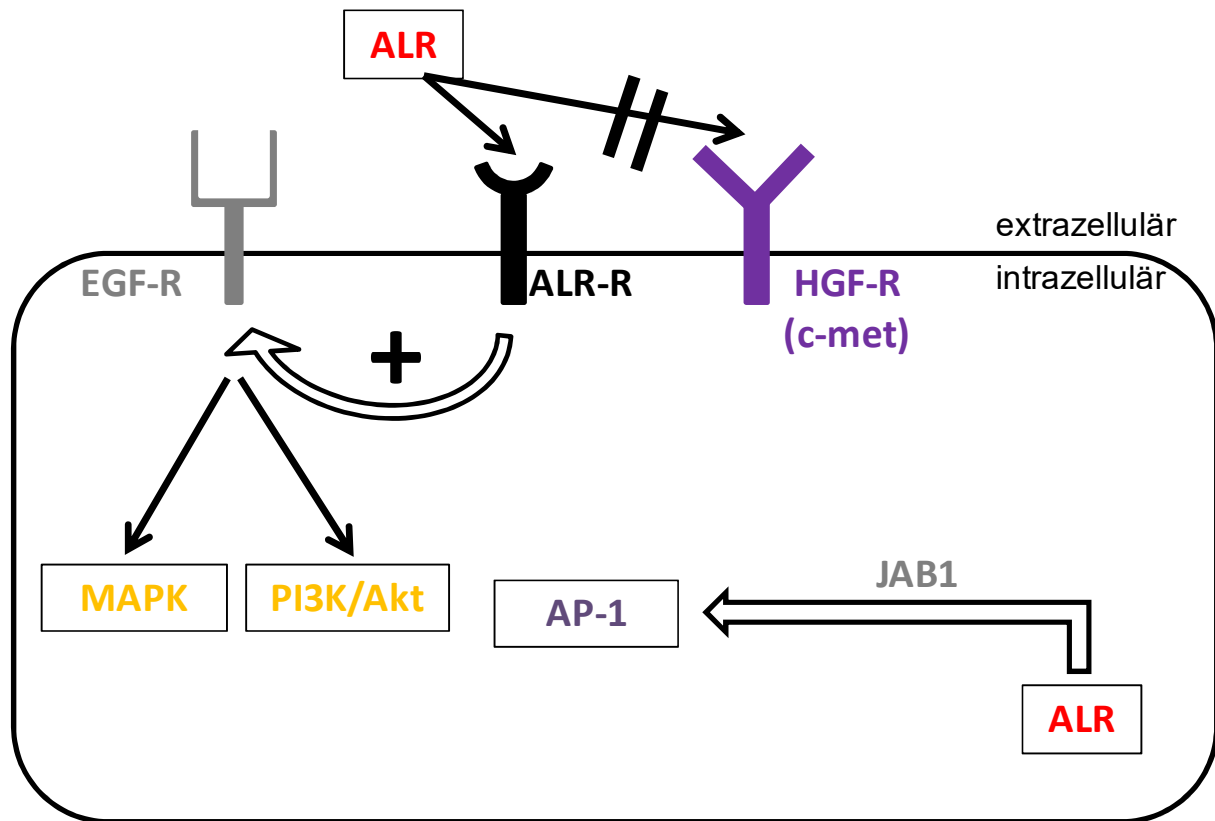
#### *1.2.3.1 Wirkmechanismen*

Bezüglich der Wirkmechanismen kann man zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Wirkweise unterscheiden, da das Protein unterschiedliche Signalwege aktivieren kann.

Extrazelluläres ALRp bindet an einen spezifischen Rezeptor an der Oberfläche von Hepatozyten (Li 2001; Wang 1999a). Es konnte gezeigt werden, dass auch Kupferzellen einen ALR-Rezeptor besitzen, welcher zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehört (Gandhi 2010).

Die Aktivierung des membranständigen Rezeptors der Hepatozyten führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der MAPK-Signalkaskade (Lu 2002a). Dies geschieht durch Interaktion mit dem EGF-Rezeptor. Eine Bindung von ALRp an den EGF-Rezeptor ist dazu aber nicht notwendig. Es konnte beobachtet werden, dass die Effekte von ALRp auf Hepatozyten von einem spezifischen Inhibitor der EGFR-Tyrosinkinase intrazellulär blockiert werden können. Eine extrazelluläre EGFR-Blockade durch bestimmte Antikörper hat hingegen keine Auswirkungen auf die ALR-Signalkaskade (Li 2000). Diese Interaktion mit dem EGF-Rezeptor ermöglicht ALR ein breites Wirkungsspektrum (Ilowski 2010; Oda 2005). Auch der PI3K/Akt-Signalweg wird durch ALR aktiviert (Ilowski 2009). Für einen Überblick über die Signaltransduktion von ALR siehe Abbildung 4.

Das enzymatische Spektrum von ALRp ermöglichen die bereits erwähnten Cysteine und das gebundene FAD-Molekül (Farrell 2005; Wu 2003). So ist ALR als Sulyhydroxidase in der Lage, die Bildung von Disulfidbindungen zu katalysieren (Lisowsky 2001).



**Abbildung 4:** Die Signaltransduktion von ALR. Auf den HGF-Rezeptor (HGF-R) besitzt ALR keinen Einfluss. Es bindet an einen membranständigen Rezeptor (ALR-R), über welchen die Tyrosinkinase des EGF-Rezeptors aktiviert wird. Von dort aus und über seinen eigenen Rezeptor aktiviert es den MAPK- und PI3K/Akt-Weg. Das intrazelluläre ALR ist über die Aktivierung von AP-1 in der Lage, Transkriptionsvorgänge zu regulieren.

### 1.2.3.2 Intrazelluläre Aufgaben

Über die intrazellulären Aufgaben von ALR ist bis heute nur wenig bekannt. Durch die bereits erläuterte Lokalisation in den Mitochondrien, im Zellkern und Zytosol kann man jedoch auf zahlreiche Funktionen schließen.

So ist das im Intermembranraum der Mitochondrien befindliche 23 kDa ALRp in der Biogenese von zytosolischen Fe/S-Proteinen und dem Transport derartiger Proteine aus der mitochondrialen Matrix in das Zytosol eingebettet (Lange 2001). In dieser Lokalisation ist ALRp auch in der Lage, Cytochrom C zu reduzieren - mit möglichen Auswirkungen auf die Zellviabilität (Farrell 2005; Gandhi 2012). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der ALR-Synthese zu apoptotischem/nekrotischem Untergang von Hepatozyten führt. Hieraus kann man schließen,

dass ALRp einen wichtigen Überlebensfaktor für Leberzellen darstellt (Thirunavukkarasu 2008).

Die Fähigkeit des intrazellulären ALRp mit AP-1 zu interagieren, ermöglicht einen intrakrinen, proliferationsfördernden Effekt (Lu 2002a). Als entscheidend für die Interaktion konnte das intakte CXXC-Motiv am C-Terminus des ALRp identifiziert werden. Für die extrazelluläre Funktionsfähigkeit scheint dieses Motiv nicht von Bedeutung zu sein (Chen 2003).

ALR besitzt desweiteren die Fähigkeit, den epithelialen Zellverband zu stabilisieren. Eine erhöhte Expression von ALRp reduziert die Zellmotilität und geht mit einer geringeren Gefäßinvasionsrate durch HCC-Zellen einher. ALR wirkt somit antimetastatisch (Dayoub 2011).

Auch in anderen Organen besitzt ALRp intrazelluläre Aufgaben. In einem Nierenzellmodell stellte sich heraus, dass das endogene ALR für die Produktion von Zytokinen bei einer Hypoxie/Reoxygenations-induzierten Inflammation der Niere von Bedeutung ist. So führt eine Verminderung von intrazellulärem ALRp zu einer verminderten Zytokinantwort (Yan 2015b).

### *1.2.3.3 Extrazelluläre Aufgaben*

Über die Interaktion mit einem spezifischen ALR-Rezeptor an der Zellmembran stimuliert ALR die DNA-Synthese in Hepatozyten (Wang 1999a). Dies geschieht unter anderem über den MAPK-Weg durch Induktion von Polyaminen, welche für Leberwachstum und Proliferation wichtig sind (Dayoub 2006). Auch eine Reduktion von Cytochrom P450 durch ALRp scheint für die Stimualtion der DNA-Synthese eine Rolle zu spielen (Thasler 2006). Neben diesen gibt es noch eine Reihe weiterer Transduktionswege, über welche ALR die hepatische Regeneration und Proliferation vorantreiben kann (Gandhi 2012).

Auch auf NK-Zellen besitzt das extrazelluläre ALRp einen Einfluss. So vermindert es in Ratten die lytische Aktivität der NK-Zellen, besitzt aber keinen Einfluss auf die mononukleären Leukozyten. Dies legt eine lokale, hepatisch-protective Wirkung von ALR nahe (Francavilla 1997). Im Menschen gehen erhöhte Konzentration von ALR im Blut mit einer erniedrigten Anzahl an NK-Zellen einher (Tanigawa 2000). So scheint ALR auch extrazellulär durch Inhibition von zellschädigenden Zellen, die Leberregeneration voranzutreiben.

Ebenso besitzt ALR auf die in der Leber vorkommenden Kupfferzellen einen tran-

skriptionsregulierenden Effekt. Über einen Cholera-Toxin-sensitiven G-Proteingekoppelten Rezeptor und in Folge dessen über die p38-MAPK- und NFκB-Aktivität, führt ALR bei Ratten zu vermehrter Bildung von IL-6 und TNF-α, welche wiederum in der Lage sind die hepatische Proliferation zu steigern (Gandhi 2010).

Ein weiterer Aspekt der Funktionen des extrazellulären ALR ist die Entzündungsmodulation. In einem Ratten-/Mausmodell, in welchem mittels appliziertem LPS eine Endotoxämie erzeugt wurde, konnten erhöhte Serumlevel von ALRp beobachtet werden. Auch bei anderweitigen Schädigungen der Leber, zum Beispiel im Rahmen einer portokavalen Shunt-Operation oder eines hämorrhagischen Schockes, konnten erhöhte Serumkonzentrationen von ALRp gemessen werden. Dies legt nahe, dass ALR als sogenanntes DAMP ("*damage associated molecular pattern*") - als Alarm-signal - bei Leberschädigung früh freigesetzt wird und so als inflammatorischer Mediator fungiert. ALR wird auch als Biomarker für hepatozelluläre Inflammation beschrieben (Vodovotz 2012).

In der Niere wurden Untersuchungen bezüglich des protektiven Effektes von ALR auf Hypoxie/Reoxygenation-induzierte Stressantwort angestellt (Li 2014; Liao 2010; Liao 2012). In HK-2 Zellen konnte gezeigt werden, dass das extrazelluläre ALR die Zytokinantwort auf die Hypoxie-Situation vermindert. Einerseits kann dies über eine Reduktion des intrazellulären ALRp geschehen, welches wie bereits erwähnt offenbar für die Zytokinantwort in diesen Zellen notwendig ist, andererseits könnte extrazelluläres ALRp auch über seinen membranständigen Rezeptor Einfluss darauf haben. Unabhängig davon, welcher Ausgangsweg genommen wird, scheint der Mechanismus dieser verminderten Zytokinbildung jedoch auf eine Inhibition des MAPK-Weges zu beruhen (Yan 2015b).

Obwohl es viele Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Immunmodulation und ALR gibt, ist bis heute das Wirkungsspektrum dieses Proteins nicht ganz geklärt.

### **1.3 Leberregeneration und Betrachtung der Rolle des Proteins ALR**

Die Regenerationsfähigkeit der Leber ist seit jeher eine Faszination für Wissenschaftler. Häufig wird dem griechischen Schriftsteller Homer bereits das Wissen über diese Fähigkeit in Anbetracht seiner Prometheus-Sage zugeschrieben. Umso erstaunlicher scheint es, dass bis heute bei Weitem noch nicht alle Prozesse während der Regeneration identifiziert werden konnten. Jedoch fand man in den letzten Jahren zahlrei-

che Mechanismen und Signalfaktoren, welche die Regeneration in Gang setzen, regulieren, fördern, aber auch hemmen können.

### 1.3.1 Molekulare Mechanismen der Leberregeneration

Im normalen, nicht regenerativen Zustand befindet sich die Leberzelle in der sogenannten  $G_0$ -Phase. Zum Start der Regeneration müssen die Leberzellen aus dieser in die  $G_1$ -Phase gebracht werden. Dieser Schritt wird als "*Priming*" bezeichnet. In einem weiteren erfolgt dann die Überführung in die S-Phase der Zellteilung. Für das Priming bedarf es der Freisetzung von Zytokinen, wie IL-6 und TNF- $\alpha$ , wie das bei einer Leberzellschädigung zu beobachten ist. Eine mögliche Schädigung stellt auch die partielle Hepatektomie dar, welche als gängiges Versuchsmodell für Untersuchungen der Regenerationsfähigkeit der Leber dient. Nach dem Erreichen der  $G_1$ -Phase sind es Wachstumsfaktoren, wie HGF, EGF, aber auch das Komitogen Insulin, welche für den weiteren Verlauf des Zellzyklus entscheidend sind. Hierbei sind zahlreiche Signalwege und Transkriptionsfaktoren beteiligt. In der Physiologie und Pathophysiologie dieser Vorgänge wird auch die Rolle potentieller Inhibitoren diskutiert. Hervorzuheben sind hier TGF- $\beta$  und Activin, welche in der Lage sind, die Proliferation der Hepatozyten zu hemmen. Die Regeneration scheint also ein streng regulierter Vorgang der humanen Pathologie zu sein (Fausto 1995; Fausto 2000; Michalopoulos 1990; Michalopoulos 2014). Einen Überblick über die Abläufe zeigt die Abbildung 5.

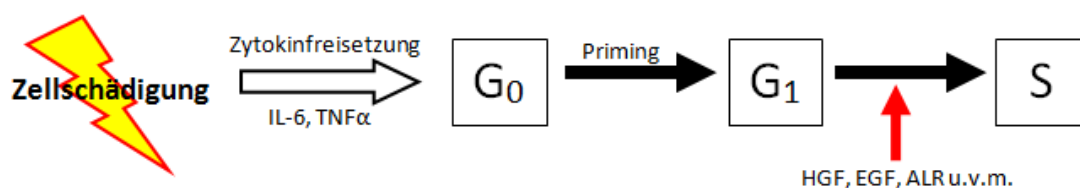


Abbildung 5: Verlauf der Leberregeneration nach Zellschädigung. Nach Schädigung werden Zytokine freigesetzt, welche das Priming vornehmen. Danach sind Wachstumsfaktoren, wie ALR, in der Lage die DNA-Synthese zu stimulieren.

### 1.3.2 Die Rolle von ALR im Rahmen der Regeneration

Wie auch in Abbildung 5 zu erkennen, ist ALR im Bereich der (co-)mitogenen Faktoren einzuordnen. ALR ist alleine nicht in der Lage, für das Priming zu sorgen, kann jedoch potent nach diesem Schritt die DNA-Synthese in Hepatozyten steigern (Fausto 1995; Wang 1999a).

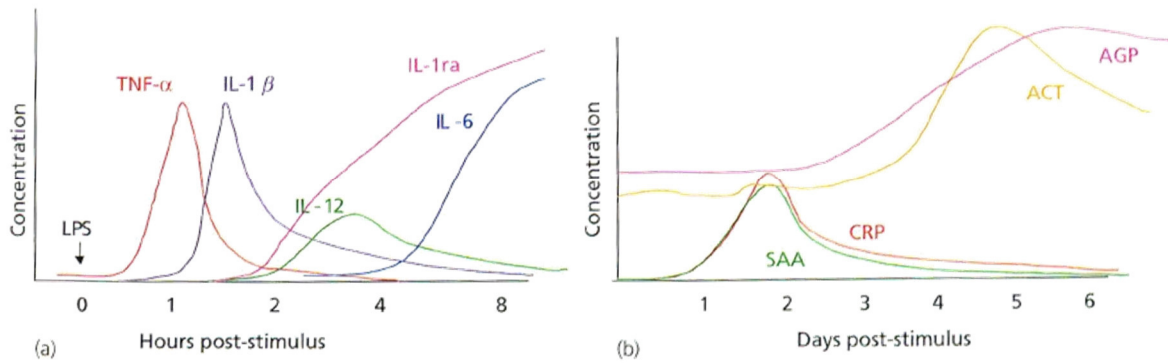
## 1.4 Die Akut-Phase-Reaktion

### 1.4.1 Auslösung und Ablauf einer Akut-Phase-Reaktion

Eine APR kann durch zahlreiche Stimuli ausgelöst werden. Unabhängig von der Art der Verletzung ist das Ausmaß der Antwort von der Stärke des jeweiligen Schadens abhängig. Derartige Verletzungen können beispielsweise durch Verbrennungen, Strahlung, chirurgische Eingriffe oder Infektionen verursacht werden. Die Infektion ist häufig Ausgangspunkt einer APR (Raynes 2005). Nach Infektion kommt es zum raschen Anstieg gewisser Serum-Proteine, was ein wichtiges Charakteristikum einer APR darstellt (Gadola 2012).

Ausgangspunkt dieser Konzentrationsänderung ist die Erkennung gewisser Oberflächenstrukturen, zum Beispiel von Lipopolysacchariden, durch Makrophagen (Bode 2012). Die Erkennung von LPS über den Toll-like-receptor 4 führt in Makrophagen zur vermehrten Bildung und Freisetzung von Zytokinen, wie IL-6, IL-1 $\beta$ , oder auch TNF- $\alpha$  (Raynes 2005). Im Falle von IL-6 geschieht dies vor allem über den NF $\kappa$ B-Weg (Libermann 1990). Die Zusammensetzung der unterschiedlichen Zytokine besitzt ein mannigfaltiges Wirkungsspektrum mit deutlichen Folgen für den Organismus, der eine solche Reaktion durchläuft, wie Tabelle 1 zeigt.

Der Leber kommt bei der Bewältigung der APR eine große Bedeutung zu. So wird sie nicht nur stark, bis 1500 ml/min, durchblutet und ist die erste Passage des im Darm mit Nähr- und Fremdstoffen angereicherten Blutes, sondern sie enthält auch 80% der Gewebemakrophagen (Bode 2012). Sie wird ihrer Aufgabe als Syntheseort vieler Proteine gerecht, indem sie auch einen Großteil der APPs synthetisiert, welche die unterschiedlichsten Aufgaben während einer Infektion übernehmen (Gadola 2012; Heinrich 1990). Die Abbildung 6 verdeutlicht den zeitlichen Verlauf der APR.



**Abbildung 6:** Zeitlicher Verlauf einer APR. Zeitlicher Verlauf der Induktion von Zytokinen (a) und Akut-Phase-Proteinen (b) nach einem akuten inflammatorischem Stimulus, wie LPS. Bereits nach wenigen Stunden kommt es zu einem Konzentrationsanstieg der Zytokine. Diese bewirken mit einer Latenz von mehreren Stunden bis Tagen dann die Konzentrationserhöhung der APPs. ACT, Antichymotrypsin; AGP, Acid Glycoprotein; CRP, C-reaktives Protein; IL, Interleukin, SAA, Serum Amyloid A; TNF, Tumor Nekrose Faktor (Raynes 2005).

**Tabelle 1:** Auswirkungen der APR auf den Organismus (modifiziert nach Raynes 2005).

<b>Metabolische Auswirkungen</b>
Verlust von Muskel und negative Stickstoff-Bilanz (Protein-Katabolismus)
Verringerte Gluconeogenese (Lactat etc. wird nicht länger zu Glucose umgewandelt)
Osteoporose (bei chronischer Entzündung)
Erhöhte hepatische Lipogenese
Erhöhte Lipolyse im Fettgewebe
Erhöhte Triglyceride im Serum und verringerte High-density Lipoproteine
Kachexie
Erhöhter Bedarf an Glutamin in sich schnell teilenden Immunzellen mit einem möglichen Mangel an Glutamin
<b>Änderungen der Nährstoffe</b>
Reduktion von Serum-Eisen, - Zink, -Kupfer
Reduktion von Retinol im Plasma
Erhöhte Glutathion-Konzentrationen
<b>Hämatopoetische Veränderungen</b>
Reduzierte Zahl an roten Blutkörperchen
Vermeehrt Neutrophile
Vermeehrt Plättchen
<b>Neuroendokrine Änderungen</b>
Fieber
Somnolenz
Erhöhung von Corticotropin-Releasing Hormone, Corticotropin und Cortisol
Erhöhte Sekretion von Arginin-Vasopressin
Minderung von Insulin-like growth factor 1
Erhöhte Sekretion von Katecholaminen
<b>Hepatische Veränderungen</b>
Positive und negative Akut-Phase-Proteine
Erhöhung von Metallothionein, Häm-Oxygenase etc.

## 1.4.2 Interleukin 6 und seine Bedeutung bei der Akut-Phase-Reaktion

### 1.4.2.1 Strukturelle Betrachtung von Interleukin 6

Interleukin 6, auch Interferon  $\beta_2$  genannt, ist als einer der Hauptfaktoren verantwortlich für die Induktion einer Akut-Phase-Reaktion (Raynes 2005). Jedoch besitzt IL-6 auch zahlreiche andere Funktionen, wie zum Beispiel die Anregung der Proliferation oder Differenzierung diverser Zellen, auch auf Hormone hat IL-6 einen Einfluss (Gadola 2012).

Das IL-6-Gen ist beim Menschen auf Chromosom 7 lokalisiert und es besitzt 5 Exons. Es kodiert für ein 212 Aminosäuren langes Propeptid und wird posttranslational durch Glykolisierung und Phosphorylierung modifiziert. Das aktive/reife Protein besitzt eine Länge von 184 Aminosäuren. Es besteht aus vier  $\alpha$ -Helices. Helix A und Helix B liegen parallel zueinander. Helix B ist über einen derart kurzen Loop mit Helix C verbunden, sodass sich dieses nur antiparallel zu Helix B positionieren kann. Helix D verläuft wieder parallel zu Helix C (s. Abbildung 7). Das Protein besitzt auch eine Disulfidbrücke (Heinrich 1998). Für die Bindung an einen Rezeptor enthält IL-6 drei Bindedomänen. Bindungsstelle 1 ist für die Bindung an den IL6-R, die Bindestellen 2 und 3 für die Bindung an gp130 verantwortlich (Heinrich 1998; Kishimoto 2003).

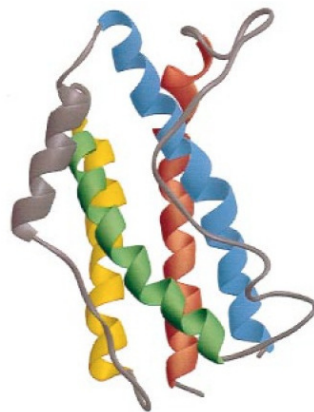


Abbildung 7: IL-6-Struktur im Ribbon-Modell. Die Helix A ist rot, B grün, C gelb, D blau und die Verbindungs-Loops grau dargestellt (Heinrich 1998).

### 1.4.2.2 Die Signaltransduktion von IL-6

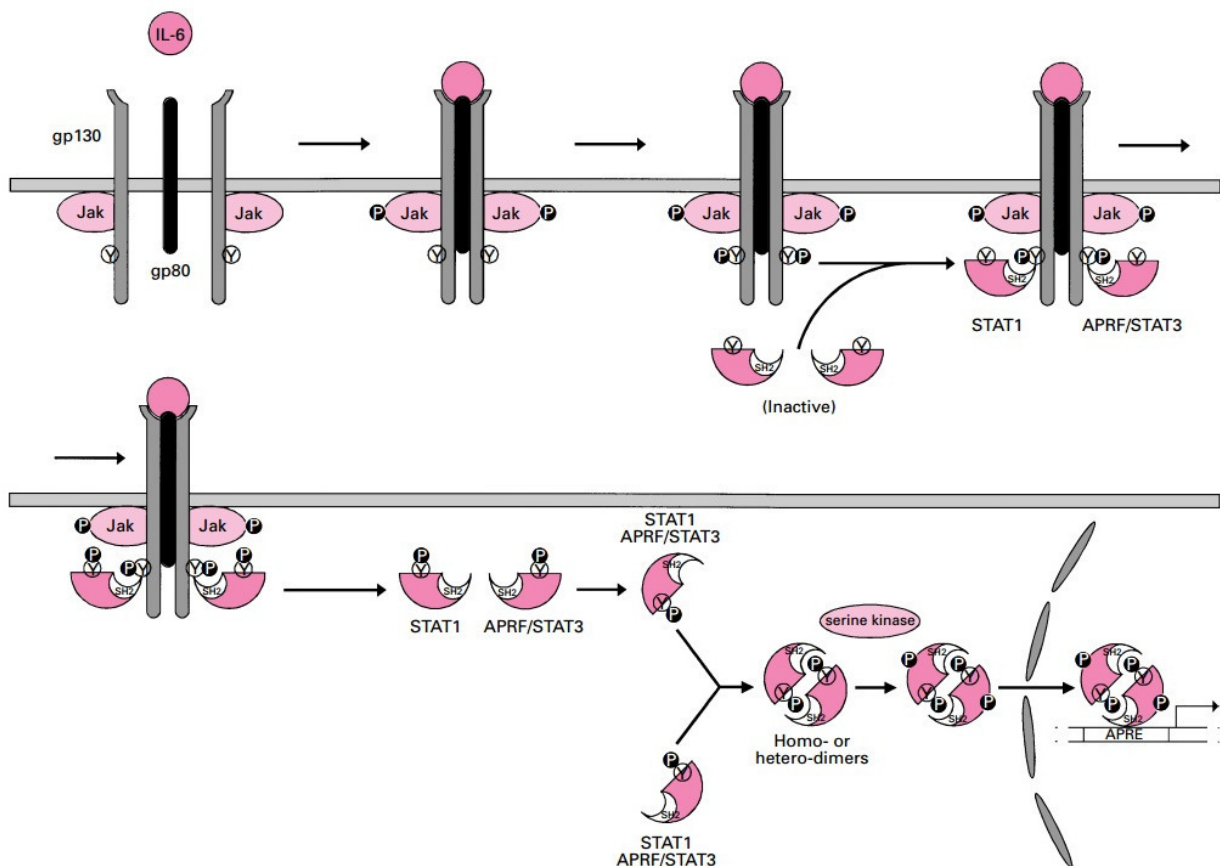
Auch der IL-6R ist in mehrere Untereinheiten unterteilbar. IL-6 bindet zuerst an eine 80kDa große  $\alpha$ -Untereinheit, auch  $\alpha$ -Rezeptor oder gp80 genannt, welche an der eigentlichen Signaltransduktion nicht beteiligt ist. Für die Übertragung des Effektes ist dann ein zweiter, 130kDa großer Partner verantwortlich, welcher als  $\beta$ -Untereinheit

oder als gp130 bezeichnet wird und nach Bindung von IL-6 an gp80 mit diesem interagiert (Heinrich 1998; Kishimoto 2003).

Das während einer APR freigesetzte IL-6 bindet zuerst an den  $\alpha$ -Rezepter, welcher zwei Bindedomänen für IL-6 besitzt: Eine Ig-ähnliche und eine CBM-Domäne. Es zeigte sich jedoch, dass auch Mutanten mit der fehlenden Ig-Domäne das IL-6-Signal übertragen können, was darauf hindeutet, dass vor allem das CBM für die Signaltransduktion des Rezeptors verantwortlich ist (Yawata 1993).

Nach dieser Bindung wird das membrangebundene gp130 in Form einer Homodimerisierung rekrutiert, welches mit dem IL-6-IL-6R-Komplex interagiert. Dies wird durch die bereits erwähnten unterschiedlichen Bindestellen im IL-6-Protein ermöglicht (Heinrich 1998).

Für die weitere Signaltransduktion ist dann gp130 verantwortlich. Eine Assoziation mit Janus-Kinasen ermöglicht die Beeinflussung der Transkription unterschiedlicher Gene über manifolde Wege, besonders erwähnt sei an dieser Stelle der STAT3-Weg, siehe dazu Abbildung 8 (Heinrich 1998; Kishimoto 2003).



**Abbildung 8:** IL-6-Signaltransduktion. IL-6 führt zu einer Dimerisierung der gp130-Moleküle. Die assoziierten Janus-Kinasen werden dadurch aktiviert und phosphorylieren den zytoplasmatischen Teil von gp130, wodurch Andockstellen für die STAT-Faktoren entstehen. Die STAT-Proteine werden ebenso phosphoryliert und bilden dann Homo- oder Heterodimere.

Hierauf folgt die Translokation in den Zellkern, in welchem sie die Gen-Transkription regulieren. Zusätzlich sind STAT-Faktoren noch Substrate von Serin-Kinasen. Abkürzungen: APRF, acute-phase response factor; APRE, acute-phase response element; eingekreistes Y, Tyrosin; P in schwarzem Kreis, Phosphat (Heinrich 1998).

Dieses anschauliche Modell der Signaltransduktion stellt sich in der Realität viel komplexer dar. So gibt es nicht nur unterschiedliche Arten der gp130-assoziierten Kinasen (Jak1, Jak2 und Tyk2), sondern diese aktivieren auch viele unterschiedliche Faktoren (STAT3, 1 und 5, C/EBP, NFκB und weitere), sodass ein umfangreiches Spektrum an unterschiedlichen Transduktionswegen und Hierarchien zwischen den verschiedenen Wegen entsteht (Bode 2012; Heinrich 1998; Kishimoto 2003; Natsuka 1991).

### **1.4.3 IL-6-Signal-Regulation**

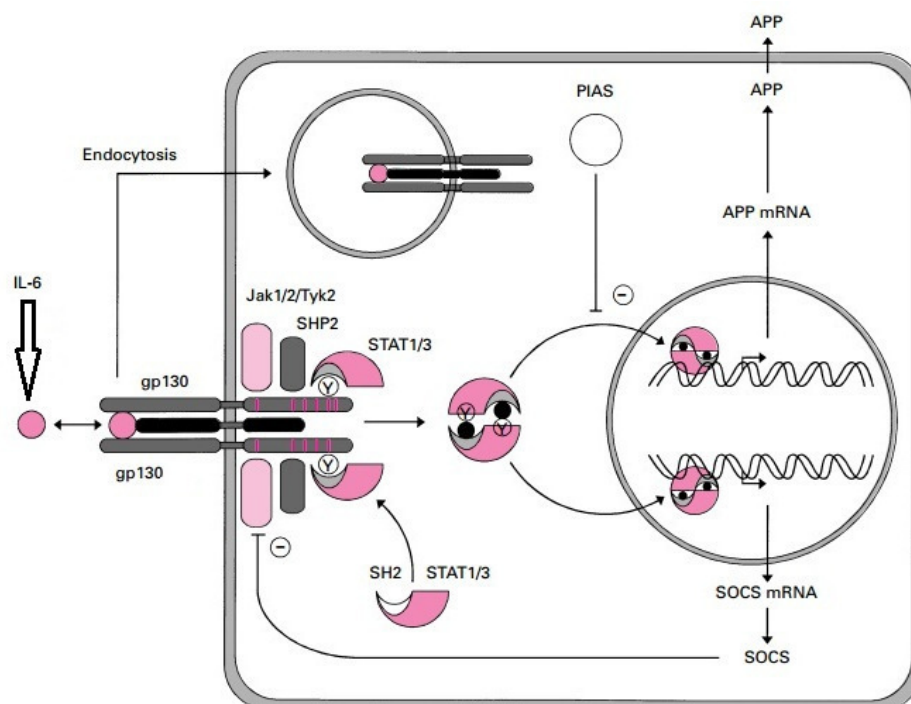
Die Regulation des IL-6-Signals unterliegt einem komplexen Mechanismus. Zwei Familien von Inhibitoren konnten identifiziert werden, welche das IL-6-Signal negativ regulieren: SOCS und PIAS.

SOCS-1, auch bekannt als SSI-1 oder Jab-1, reguliert das Signal durch Interaktion mit den Janus-Kinasen (Naka 1997; Starr 1997). Dieser Inhibitor wird direkt von IL-6 induziert und wirkt als negative Rückkopplung, indem es über eine SH2-Domäne mit den Jaks interagieren kann und diese somit hemmt. Es ist eine ganze Familie von SOCS-1 bis -7 beschrieben, welche von unterschiedlichen Zytokinen induziert bzw. reguliert werden und auch auf unterschiedliche Weisen wirken (Krebs 2001; Starr 1997). Für IL-6 spielen vor allem die Proteine SOCS-1 und -3 eine entscheidende Rolle (Kishimoto 2003; Krebs 2001).

Im Gegensatz zu den SOCS-Proteinen sind PIAS konstitutiv exprimiert. Auch hier gibt es wieder mehrere "Familienmitglieder". Und wie bei den SOCS-Proteinen gibt es hier zwei von besonderer Bedeutung: PIAS-1 und PIAS-3 (Chung 1997; Liu 1998). Diese Proteine interagieren mit den STAT-Proteinen und verringern deren DNA-Bindfähigkeit bzw. deren transkriptionsregulatorische Eigenschaften (Kishimoto 2003).

Ein weiterer negativer Effekt besteht im Abbau von IL-6 selbst. In Ratten besitzt IL-6 eine Plasma-Halbwertszeit von etwa zwei Minuten (Castell 1988). Hauptsächlich verantwortlich für die schnelle Elimination ist die Leber. In ihr akkumuliert IL-6 und wird abgebaut (Castell 1990; Sonne 1990). Auch der Rezeptor unterliegt einer Regulation. Nach Bindung von IL-6 an dessen Rezeptor an der Zelloberfläche wird dieser rasch

in die Zelle aufgenommen, was zu einem kompletten Verlust von IL-6-Bindungsstellen an der Oberfläche führen kann (Dittrich 1994; Nesbitt 1992; Zohlnhöfer 1992). Um die Anzahl der Bindungsstellen wieder zu erhöhen, ist eine de-novo-Proteinsynthese nötig. Dies deutet auf einen lysosomalen Abbau des endozytierten Rezeptorkomplexes hin. Für die Endozytose ist vor allem gp130 zuständig (Dittrich 1996). Ein Überblick über die wichtigsten Mechanismen der Signalregulation ist auf Abbildung 9 zu sehen.



**Abbildung 9:** Die negative Regulation des IL-6-Signales. Es gibt zahlreiche Mechanismen, die den Signalweg von IL-6 regulieren, zum Beispiel die Endozytose des Rezeptors, die Induktion von Feedback-Inhibitoren (SOCS) oder andere inhibitorische Protein (PIAS). Auch die Phosphatase SHP2 wird als Regulationsmechanismus angegeben (Heinrich 1998).

#### 1.4.4 Interleukin 1( $\beta$ ) und seine Bedeutung in der Akut-Phase-Reaktion

Ein weiteres Zytokin, welches von großer Bedeutung in der APR ist, ist IL-1 $\beta$ . Als Zytokin reagiert es wie IL-6 auf verschiedene Stimuli und wird im Entzündungsgeschehen vermehrt gebildet. Seine Wirkung auf die Expression der APPs kann man jedoch differenzieren. So gibt es eine Gruppe von APPs, welche nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von IL-1 und IL-6 maximal produziert wird (Horn 1995). Es gibt aber auch Proteine, welche bei gleichzeitigem Vorhandensein von IL-6 und IL-1 $\beta$  vermindert produziert werden - im Vergleich zu einfacher Anwesenheit von IL-6 (Bode 2012). Durch diese duale Eigenschaft kommt es zum Beispiel dazu, dass IL-1 $\beta$  die Produktion von CRP in Kombination mit IL-6 verstärkt. Die Produktion von  $\alpha$ 2-

Macroglobulin oder  $\gamma$ -Fibrinogen wird von IL-1 $\beta$  bei gleichzeitiger Stimulation mit IL-6 hingegen gehemmt. Für diese Inhibition wird eine Beeinflussung des STAT-Weges - zum Beispiel durch eine reduzierte Phosphorylierung von STAT3 - über den NF $\kappa$ B-Weg als ursächlich angesehen (Bode 2012).

Auch der Einfluss von SOCS-Proteinen wird in der Regulation der IL-6-Antwort diskutiert. Es gibt Hinweise darauf, dass IL-1 $\beta$  in Anwesenheit von IL-6 die Regulation des SOCS-3-Proteins beeinflusst. So scheint die Expression von SOCS-3 bei gleichzeitigem Vorhandensein von IL-6 gesteigert zu werden, jedoch ist deren Rolle bei der Beeinflussung des Signals umstritten (Bode 2012; Yang 2004).

Dieses Beispiel eines weiteren Zytokins zeigt, wie vielfältig die Reaktionen im Entzündungsablauf sind. Unterschiedliche Zytokine beeinflussen sich teils agonistisch und antagonistisch, abhängig von den jeweiligen Proteinen, die man betrachtet. Das lässt also darauf schließen, dass die Vorgänge im Organismus während einer Entzündung starker Regulation und feiner Abstimmung unterliegen.

#### **1.4.5 Überblick über die in der Arbeit untersuchten Akut-Phase-Proteine**

##### *1.4.5.1 Ein allgemeiner Überblick über die APPs und deren Gruppierung*

Ähnlich wie bei den Zytokinen gibt es auch bei den APPs eine große Anzahl an verschiedenen Vertretern. Im Folgenden soll ein Überblick über die Gruppierung der APPs gegeben werden. Eine Möglichkeit besteht darin, die Proteine nach deren Plasma-Konzentrationsänderung während der Akut-Phase zu ordnen. Es gibt Proteine, welche während dieser Reaktion mit einer erhöhten Konzentration reagieren, andere hingegen reagieren mit einer Erniedrigung. Dementsprechend bezeichnet man die Proteine als positive APPs (bei Erhöhung) oder als negative APPs (bei Erniedrigung). Tabelle 2 gibt einen Überblick über die bedeutendsten APPs. Über den Sinn einer Erniedrigung von bestimmten Proteinen während einer Entzündung wird bis heute diskutiert. Einerseits ist es sinnvoll, Proteine geringer zu exprimieren, welche APPs entgegen wirken würden, die wiederum vermehrt exprimiert werden. Andererseits könnte sich der Organismus während einer oft lebensbedrohlichen Entzündungsreaktion in erster Linie darauf konzentrieren, jene Situation zu beseitigen. Um keine Ressourcen zu verschwenden, werden Proteine, welche für die Bewältigung dieser Situation nicht essentiell sind, vermindert produziert, um die vermehrte Synthese von dringend benötigten APPs zu ermöglichen (Raynes 2005).

Eine weitere Einteilung ermöglicht deren Reaktion auf IL-6. So gibt es APPs, die nur

durch die Kombination von IL-6 und IL-1 maximal exprimiert werden. Diese Gruppe von Proteinen wird auch als Typ 1 APPs bezeichnet. Zu ihr gehören unter anderem  $\alpha$ 1-saures Glykoprotein, CRP, Haptoglobin, Hämoexin, Komplementfaktor B oder Serum Amyloid A. Diesen stehen die Typ 2 APPs gegenüber, die auch durch IL-6 alleine zu maximaler Expression gebracht werden können. Dies sind zum Beispiel  $\alpha$ 1-anti-Chymotrypsin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Fibrinogen und (nur in Ratten)  $\alpha$ 2-Macroglobulin (Horn 1995).

Tabelle 2: Überblick über die APPs (modifiziert nach Gadola 2012).

<b>Positive APPs</b>	
Wundheilung	$\alpha$ 1-saures Glykoprotein
Gerinnung	Fibrinogen, Fibronectin Prothrombin Von-Willebrand-Faktor
Komplementsystem	C1-Inhibitor, C2-, C3-, C4- bindendes Protein, C5 Faktor B Plasminogen Mannosebindendes Pro- tein/Lektin
Pentraxine	CRP
SAA	Serum Amyloid A
Eisen- / Kupferhä- mostase	Caeruloplasmin Ferritin Hepcidin
Häm-Entsorgung	Haptoglobin (Hämoglobin- Scavenger), Häm-Oxygenase, Hämoexin
Kalzium-Phosphat- Stoffwechsel	Procalcitonin
Proteasenhemmer	$\alpha$ 1-anti-Chymotrypsin $\alpha$ 2-Macroglobulin $\alpha$ 1-anti-Trypsin Heparin Kofaktor 2
<b>Negative APPs</b>	
Transportproteine	Albumin, Transferrin, Apoli- poprotein-1, -B
Gerinnung	Antithrombin (bei Abfall vermehrter Gerinnungsnei- gung)
Hormonbindende Proteine	Transthyretin, Transcortin, reti- nolbindendes Protein

#### *1.4.5.2 Antithrombin (III)*

Antithrombin (III), AT, gehört zur Gruppe der negativen APPs, dessen Erniedrigung zu einem prokoagulatorischem Effekt führt (Ahmed 2012; Geerts 1996; Niessen 1997; Penner 1995; Raynes 2005; Riker 1996).

Antithrombin ist ein Serin-Protease-Inhibitor (auch Serpin genannt), welcher physiologisch Thrombin (Faktor IIa) und Faktor Xa der Blutgerinnungskaskade inaktiviert. Desweiteren ist AT in der Lage die Faktoren IXa, XIa, XIIa, den tPA, die Urokinase, Trypsin, Plasmin und Kallikrein zu inaktivieren, jedoch dies in geringerem Maße als die beiden erstgenannten (Bauer 1991; Patnaik 2008).

Strukturell ist AT ein  $\alpha_2$ -Globulin, welches hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird. Es enthält 432 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 58,2 kDa und eine Halbwertszeit von ungefähr 2,4 Tagen. Von den beiden vorhandenen Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  macht die  $\alpha$ -Isoform bis zu 95% aus (Patnaik 2008). Physiologisch zirkuliert AT in einer Form, welche nur geringe Aktivität aufweist. Die Aktivität von AT wird vor allem durch die Gegenwart von Heparin oder anderen Heparin-ähnlichen Glykosaminoglykanen gesteigert (zum Beispiel Heparansulfat). AT besitzt für Heparin eine Sequenz-spezifische Pentasaccharid-Domäne, an welche Heparin bindet und dadurch die Konformation von AT ändert. Dies beschleunigt die Inaktivierung von Faktor Xa. Die Inhibition von Thrombin erfordert eine weitere Bindung von Heparin an jenes. Dieser ternäre Komplex ermöglicht dann die Hemmung von Thrombin (Patnaik 2008). Physiologisch wird AT vor allem durch die am Endothel vorhandenen Heparansulfate aktiviert und ist so in der Lage die Blutgerinnung am Endothel zu verhindern (Mammen 1998).

Auch im Entzündungsgeschehen ist AT involviert. Durch die Hemmung von Thrombin und Faktor Xa reduziert es die Thrombin/FXa-abhängige Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen. Durch das Binden von Heparansulfat auf der Endotheloberfläche erhöht es die Produktion von Prostacyclin (Patnaik 2008). Es wurden noch weitere antiinflammatorische Eigenschaften von AT entdeckt. Jedoch scheint für diese eine Interaktion zwischen AT und Zellen nötig zu sein, was durch Heparin antagonisiert werden kann (Wiedermann 2002).

#### *1.4.5.3 Fibrinogen $\beta$*

Auch Fibrinogen  $\beta$  ist ein Protein, welches Einfluss auf das Gerinnungssystem besitzt. Es ist Bestandteil des hexameren Fibrin-Moleküls, welches sich aus je zwei Mo-

lekülen  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$  und  $\gamma$  zusammensetzt. Als Hexamer  $(\alpha\alpha\beta\beta\gamma)_2$  wird das 340 kDa große Protein von Hepatozyten sezerniert (Doolittle 1984; Fish 2012; Mosesson 2005). Physiologisch ist Fibrinogen ein Vorläuferprotein, welches erst durch die Thrombinvermittelte Abspaltung der Fibrinopeptide A und B aktiviert wird. Als Folge dieser Abspaltung polymerisiert das Protein spontan, was mit anderen Schritten zur Blutgerinnung beiträgt (Doolittle 1984; Mosesson 2005). Die Funktion von Fibrin ist jedoch nicht auf die reine Netzbildung beschränkt. Es gibt eine Reihe weiterer Interaktionen mit anderen Bestandteilen des Gerinnungs- und Abwehrsystems (Mosesson 2005). Für diese Arbeit von besonderer Bedeutung ist jedoch viel mehr die Stellung von Fibrinogen während einer Entzündung. Der Körper reagiert in der Akut-Phase mit einer Erhöhung der Fibrinogen-Produktion - Fibrinogen ist also ein positives APP (Heinrich 1990; Mackiewicz 1991; Raynes 2005). Fibrinogen kommt hierbei nicht nur die Aufgabe des Verschlusses einer potentiellen Verletzung über die Blutgerinnung zu, was den Wundverschluss fördert und den Blutverlust verringert, sondern man schreibt dem Protein auch Einflüsse auf Wundheilung, Zellmigration und Zellproliferation zu (Drew 2001; Raynes 2005).

#### *1.4.5.4 Haptoglobin*

Haptoglobin (HP), auch Hämoglobin-Scavenger genannt, zählt zur Gruppe der positiven APPs. Auch dieses Protein wird in der Leber produziert und wird hauptsächlich von IL-6 induziert (Raynes 2005; Wang 2001). Eine Hauptaufgabe von HP während einer APR besteht in der Bindung von freiem Hämoglobin, dessen Vorhandensein als ein Warnsignal für den Organismus gilt (Quaye 2008; Raynes 2005).

Im Menschen gibt es drei Allele des Proteins. Je nach Oligomerisierung dieser Produkte ergeben sich unterschiedliche Phänotypen, welche als HP1-1, HP1-2 (oder 2-1) und als HP2-2 bezeichnet werden (Polticelli 2008; Quaye 2008).

Haptoglobin wird als eine einzige Peptidkette synthetisiert, welche dann in eine N-terminale, leichtere  $\alpha$ - und eine C-terminale, schwere  $\beta$ -Kette gespalten wird (Gordon 1968). Über eine Disulfidbrücke werden beide Ketten miteinander verbunden (Wejman 1984). Hämoglobin bindet an die  $\beta$ -Kette, was zu einer 1:1-Stöchiometrie von HP und Hb führt (Polticelli 2008). Für die Beseitigung des an HP gebundenen Hb ist eine Bindung an den Hb-Scavenger-Rezeptor, CD163, von Nöten. Dieser Rezeptor bindet ausschließlich den Komplex von HP und Hb und führt dann zu einer Endozytose (Kristiansen 2001). Rezeptoren (CD163 und andere) für diesen Komplex wur-

den auf Makrophagen und Leberzellen entdeckt (Polticelli 2008). Auch Hepatoma-Zelllinien, wie HepG2, exprimieren Rezeptoren zur Aufnahme des Komplexes und bauen diesen nach Aufnahme ab (Okuda 1992). Durch diese Fähigkeit schützt HP den Körper vor den Folgen der Hämolyse. Hierbei zeigten sich jedoch Aktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Phänotypen (Quaye 2008; Saeed 2007). Darüber hinaus besitzt HP noch eine Reihe weiterer Funktionen, welche im Entzündungsgeschehen von Nutzen sein können, wie zum Beispiel eine antioxidative Wirkung, eine Interaktion mit Apo A-1, um dieses vor Schaden durch freie Radikale zu schützen, die Inhibition von Cyclo- und Lipoxygenase oder das Mitwirken bei der Rekrutierung von Neutrophilen. Für diese zahlreichen Aufgaben spielt die Bandbreite der unterschiedlichen Phänotypen offenbar eine entscheidende Rolle (Quaye 2008).

#### *1.4.5.5 Serum Amyloid A 2*

Auch das Protein SAA2 zählt zur Gruppe der positiven APPs (Gadola 2012; Raynes 2005). Es wird als eines der bedeutendsten APPs des menschlichen Organismus angesehen und die Serum-Level sind während einer APR bis 1000-fach erhöht (Uhlar 1999).

Beim Menschen besteht die Serum Amyloid A Familie aus vier Mitgliedern (SAA1 - SAA4), von denen SAA1 und SAA2 als Akut-Phase-Form angesehen werden (Sipe 1999; Uhlar 1999; Uhlar 1999). Das SAA-Gen besteht aus vier Exons und drei Introns, was für viele Apolipoproteine charakteristisch ist. Das reife Protein besitzt eine Größe von 104 bis 112 Aminosäuren und wird hauptsächlich in der Leber produziert. Funktionell gesehen ist Serum Amyloid A ein kleines Apolipoprotein, welches während einer APR rasch mit HDL interagiert (Steel 1994; Uhlar 1999).

Über die Funktion von Serum Amyloid A und dessen Rolle im Entzündungsgeschehen ist noch vieles im Unklaren. Jedoch werden auch für SAA einige Fähigkeiten berichtet, welche für die APR und Entzündungen entscheidend sind. So konnte beobachtet werden, dass SAA die Produktion von Metalloproteinasen in menschlichen Fibroblasten steigert. Dies könnte unter anderem bei rheumatischen Erkrankungen einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen (Migita 1998). In Leukozyten steigert SAA die Produktion von Zytokinen und Chemokinen, es kann bei Makrophagen an den TLR-2 und CD36 binden und beeinflusst so deren Lipidstoffwechsel. Durch die Interaktion mit HDL werden die Apolipoproteine Apo A-1 und ApoE kompetitiv ersetzt und es kommt zu einer Modulation des Cholesterinstoffwechsels. Die Bedeu-

tung dieser Modulation ist aber noch nicht verstanden. Auch konnte man bis heute noch nicht nachvollziehen, warum es zu einem derart starken Anstieg dieses Proteins während einer APR kommt (Gadola 2012; Raynes 2005; Uhlir 1999).

## 1.5 Fragestellung der Dissertation

ALR wird im Rahmen einer Endotoxämie oder Leberzellschädigung frühzeitig von Hepatozyten freigesetzt. Das Protein führt zu einer vermehrten Produktion von Zytokinen in Kupffer-Zellen der Leber. ALR ist somit wesentlicher Bestandteil der Reaktion auf inflammatorische Signale des Organismus. ALR wird auch als Biomarker für die hepatozelluläre Inflammation beschrieben. Erhöhte ALRp-Konzentrationen werden im Rahmen dieser Reaktion aber auch systemisch in der Serumkonzentration gemessen. ALR besitzt somit nicht nur einen lokal hepatischen Effekt, sondern es lässt sich eine systemische Wirkung des Proteins vermuten. Diese systemische Bedeutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass ALR auch inflammationsmodulierende Wirkungen auf andere Organe besitzt. So führt es zum Beispiel in Nierentransplantationsmodellen zu einer Reduktion entzündlicher Vorgänge.

Auf inflammatorische Stimuli reagiert der Körper mit einer sogenannten APR. Hierbei kommt es zur Serumkonzentrationsänderung vieler Proteine, welche diagnostisch auch als Entzündungsparameter verwendet werden. Hauptort dieser Proteinproduktion ist die Leber. Bisher ist über die Bedeutung von ALR im Rahmen einer APR in der Leber nur wenig bekannt, ebenso über die Interaktion von ALRp mit nicht-gewebsständigen Makrophagen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkung extrazelluläres ALRp auf die Produktion der APPs - auf mRNA- und Protein-Ebene- in der Leber besitzt und wie ALRp mit einer nicht-gewebsständigen Makrophagen-Zelllinie bezüglich der Zytokinproduktion interagiert. Desweiteren wurden potentielle Signalwege von ALR untersucht, über welche die Effekte vermittelt werden könnten. Folgende Fragen sollen durch die Arbeit beantwortet werden:

1. Wie beeinflusst ALR die Produktion von APPs in Hepatozyten?
2. Welche Bedeutung besitzt intrazellulär vorhandenes ALR für die Produktion von APPs?
3. Beeinflusst ALR die Zytokinproduktion in einer nicht-gewebsständigen Makrophagen-Zelllinie?
4. Welche potentiellen Signalwege gibt es, über welche ALR einen Einfluss besitzen könnte?

5. Welche Bedeutung besitzen die gewonnenen Erkenntnisse für den leberregenerationsfördernden Effekt von ALR?

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte und Softwares

Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Hera Cell 150 Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Hera Safe Bench	Heraeus, Hanau, Deutschland
ImageQuant LAS 4000 mini	GE Healthcare GmbH, München, Deutschland
ImageQuant LAS 4000 Software V 1.2	GE Healthcare GmbH, München, Deutschland
Image J V 1.49	<a href="http://imagej.nih.gov/ij/">imagej.nih.gov/ij/</a>
LightCycler® 480	Roche, Basel, Schweiz
LightCycler® 480 Software 1.5	Roche, Basel, Schweiz
Magellan Data Analysis Software	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikordosierspritze 50 µl	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Mikroskop Eclipse TS 100	Nikon, Chiyoda, Japan
Mini-Protean Tetra System	Bio-Rad, München, Deutschland
NanoDrop 2000/2000c Software	ThermoFischer, Waltham, USA
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	ThermoFischer, Waltham, USA
Powerpac 200	Bio-Rad, München, Deutschland
Schüttelgerät WT 17	Biometra, Göttingen, Deutschland
Semi Dry Transfer Cell Trans-Blot SD	Bio-Rad, München, Deutschland
SigmaPlot 12.5	Systat, Erkrath, Deutschland
Tecan GENios Plus Microplate Reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Thermocycler TProfessional Basic Gradient 96 well	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie-2 G560E	Scientific Industries, NY, USA
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwendel, Deutschland
Zentrifuge 220/230 VAC	Kisker, Steinfurt, Deutschland

Zentrifuge MiniSpin Eppendorf, Hamburg, Deutschland  
Zentrifuge Universal 320 Hettich, Tuttlingen, Deutschland

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

1 ml Spritzen Becton Dickson, NJ, USA  
1,5, 2 ml Safe Seal Reagiergefäß Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland  
5, 10, 25, 50 ml Stripetten Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland  
6-Well-Platten Falcon, NY, USA  
15, 50 ml Falkons Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland  
20G Kanülen Braun, Melsungen, Deutschland  
96-well Flachboden-Platten Sigma, Steinheim, Deutschland  
100, 250, 500 ml Flaschen Schott, Mainz, Deutschland  
500 ml Bottle Top Filter Corning, NY, USA  
Combitips advanced® Eppendorf, Hamburg, Deutschland  
Chromatographiepapier 3 mm Whatman, Dassel, Deutschland  
Disposable Hemocytometer Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  
LightCycler® 480 Sealing Foil Roche, Basel, Schweiz  
Mini Protean TGX Stainfree Gel (12%) Bio-Rad, München, Deutschland  
Muiltipette stream® Eppendorf, Hamburg, Deutschland  
Muiltiply®-µStrip Pro 8er Kette Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland  
Muiltwellplatte 96 white Roche, Basel, Schweiz  
NeoTouch® Handschuhe Ansell, Brüssel, Belgien  
Pasteurpipette ohne Wasserstopfen Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  
Sealing Foil Sigma, Steinheim, Deutschland  
Zellkulturflaschen 75 cm<sup>2</sup> Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland  
Zellschaber Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

### 2.1.3 Reagenzien

2-Mercaptoethanol Merck, Hohenbrunn, Deutschland  
Albuminfraktion V (BSA) Applichem, Darmstadt, Deutschland  
ALR (rekombinant, human), 15 kDa AG Weiß, Regensburg, Deutschland  
BSA Standard for Protein Assay Interchim, Montluçon, Frankreich  
Dimethyl Sulfoxid (DMSO) Sigma, Steinheim, Deutschland

Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Steinheim, Deutschland
DL-Norleucin	Sigma, Steinheim, Deutschland
DMEM mit Phenol Red	Lonza, Verviers, Belgien
DMEM ohne Phenol Red	Lonza, Verviers, Belgien
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetal Bovine Serum	Biochrom, Berlin, Deutschland
G418	Sigma, Steinheim, Deutschland
Glycin	Sigma, Steinheim, Deutschland
IL-6 (rekombinant, human)	PeproTech, NJ, USA
Isopropanol 70%	Braun, Melsungen, Deutschland
Laemmli Sample Buffer (2x)	Bio-Rad, München, Deutschland
L-Glutamin	Sigma, Steinheim, Deutschland
LPS (Lipopolysaccharid) E.coli O127:B8	Sigma, Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver	TSi GmbH, Zeven, Deutschland
MEM (Non-essential Amino Acid Solution)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MG-132	Cell Signaling, Danvers, USA
Natrium-Chlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natrium-Dodecyl-Sulfat in Pellets	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PageRuler Prestained Protein Ladder	ThermoFischer, Waltham, USA
PD98059	Cell Signaling, Danvers, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Phosphate Buffered Saline w/o Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup>	Sigma, Steinheim, Deutschland
PhosphoSTOP EASYPack Tabletten	Roche, Basel, Schweiz
Polymyxin B	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ponceau S	Sigma, Steinheim, Deutschland
Protease Inhibitor, Complete Mini Tabletten	Roche, Basel, Schweiz
Proteinase K	Qiagen, Hilden, Deutschland
PVDF-Membran	Bio-Rad, München, Deutschland
Re-Blot Plus Mild Solution (10x)	Millipore, Temecula, USA
RPMI Medium 1640	Gibco, NY, USA
SB203580	Sigma, Steinheim, Deutschland

Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	ThermoFischer, Waltham, USA
Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate	ThermoFischer, Waltham, USA
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trizma® base (Tris)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trypsin-EDTA solution	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tryptan Blue Solution 0,4%	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tween® 20	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tyrphostin AG1478	Cell Signaling, Danvers, USA

#### 2.1.4 Analyse-Kit-Systeme

Fibrinogen Human ELISA Kit (1,25 - 80 ng/ml)	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Haptoglobin Human ELISA Kit (3,125 - 200 ng/ml)	Abcam, Cambridge, Großbritannien
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Basel, Schweiz
QuantiTec Reverse Transcription	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

#### 2.1.5 Zelllinien

HepG2	ATCC/HB-8065
RAW264.7	ATCC/TIB-71

#### 2.1.6 Primer

Alle Primer (mit Ausnahme von mActin) wurden von Metabion, Martinsried, Deutschland hergestellt, die Primer für das Gen mActin wurde von Sigma, Steinheim, Deutschland bezogen. Alle Primer sind in Tabelle 3 und 4 aufgelistet.

Tabelle 3: Humane Primerpaare für die in der linken Spalte aufgelisteten Gene.

α1Antitrypsin	atgctgccagaagacagat atgctcactggggagaagaa
Antithrombin3	gccctgtactggtcaaa

	caatgagcagcaaggacaaa
CTGF	aaatgctgagaggagtgg atccacagggtcttgaaca
CRP	tctcatgctttggccagac ctcattgtctgtctctgggt
CRP	tcgatgccaccaagagacaagaca aacacttcgccttgacttcatact
Fibrinogen $\beta$	cagggatttgaaatgttgc ccatcctggtaagctggcta
Haptoglobin	gctaagatggttcccacca tttcgctgttgcatcttctg
HPRT	tgacactggcaaaacaatgca ggccttttcaccagcaagct
IL1 $\beta$	cagccaatcttcattgctca gcatcttcctcagcttgcc
IL-6	aaagaggcactggcagaaaa caggggtggttattgcatct
IL-8	accggaaggaaccatctcactg gcatctggcaaccctacaaca
RBP4	ccgagtcaaggagaacttcg gctcatctggccggctc
SAA2	agccaattacatcggctcag atttattggcagcctgatcg
TNF- $\alpha$	cagcctcttctccttctgat gccagagggctgattagaga

Tabelle 4: Maus-Primerpaare, für die in der linken Spalte aufgelisteten Gene.

Actin	agccatgtacgtagccatcc ctctcagctgtggtggtgaa
IL1 $\beta$	gacctccaggatgaggaca agctcatatgggtccgacag
IL6	agtggttaaggaccaagacc

	tctgaccacagtgaggaatg
TNF $\alpha$	acggcatggatctcaaagac gtgggtgaggagcacgtagt

### 2.1.7 Antikörper

GAPDH (14C10) Rabbit mAb	Cell Signaling, Danvers, USA
p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody	Cell Signaling, Danvers, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	Cell Signaling, Danvers, USA
Phospho-Stat3 (Ser727) (6E4) Mouse mAb	Cell Signaling, Danvers, USA
Phospho-Stat3 (Tyr705) (D3A7) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	Cell Signaling, Danvers, USA
Polyclonal Goat Anti-Mouse	DAKO, Hamburg, Deutschland
Polyclonal Goat Anti-Rabbit	DAKO, Hamburg, Deutschland
Stat3 (124H6) Mouse mAb	Cell Signaling, Danvers, USA

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

#### 2.1.8.1 Zellernte

##### Proteinase K-Puffer für RNA-Ernte

- 350  $\mu$ l RLT-Puffer aus RNeasy Mini Kit
- 5  $\mu$ l Proteinase K
- 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercapto

##### RIPA-Puffer für Protein-Ernte

- 5 ml 5 M Tris ph 8,8
- 3 ml 5 M NaCl
- 1 ml Triton X100
- 1 ml 10% SDS
- 90 ml Wasser
- Einstellung des pH-Wertes mit HCl auf 7,2 und Auffüllen mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 100 ml

Zur Verwendung des Puffers für die Proteinernte wurden 10 ml davon mit je einer Tablette Proteinase-Inhibitor und Phospho-STOP versehen. Diese Lösung wurde für maximal eine Woche bei 4°C gelagert.

### 2.1.8.2 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

#### 10% SDS-Ladepuffer

- 10 g SDS Pellets
- 143 g Glycin
- 30,4 g Tris
- Auffüllen mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1 l

#### TBST 10x

- 90 g NaCl
- 61 g Tris
- 10 ml Tween® 20
- Einstellung des pH-Wertes mit HCl auf 7,6
- Auffüllen auf 1 l mit destilliertem Wasser

Verwendung fand TBST als 1x Lösung. Dazu wurden 100 ml 10x TBST mit 1 l Wasser vermischt.

#### Blocklösung, 5% Milchpulver

- 5 g Milchpulver
- 100 ml 1x TBST

#### BSA-Lösung

- Für 1,5%: 1,5g BSA in 100 ml 1x TBST
- Für 5%: 5g BSA in 100 ml 1x TBST

#### Anodenpuffer A

- 100 ml Methanol
- 12,5 ml Tris Cl (1M, pH 10,4)
- Auffüllen auf 500 ml mit destilliertem Wasser

#### Anodenpuffer B

- 100 ml Methanol
- 150 ml Tris Cl (1M, pH 10,4)
- Auffüllen auf 500 ml mit destilliertem Wasser

#### Kathodenpuffer

- 2,63 g DL-Norleucin

- 12,5 ml Tris Cl (1 M, pH 9,4)
- Auffüllen auf 500 ml mit destilliertem Wasser

### Primäre Antikörper

- GAPDH, p44/42 MAPK (Erk1/2): 1:1000 in 5% BSA-Lösung
- Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2): 1:2000 in 5% BSA-Lösung
- Phospho-Stat3 (Ser): 1:1000 in 5% Milchpulver
- Stat3 und Phospho-Stat3 (Tyr): 1:1000 in 1,5% BSA-Lösung

### Sekundäre Antikörper

- Anti-Rabbit: 1:10000
- Anti-Mouse: 1:3000

in Blocklösung

### 2.1.8.3 ELISA

#### 1x Diluent N

- 30 ml 10x Diluent N Lösung
- 270 ml destilliertes Wasser

#### 1x Wasch-Puffer

- 30 ml 10x Wasch-Puffer-Lösung
- 570 ml destilliertes Wasser

#### 1x Biotin gekoppelte Antikörper Lösung

- 105,6 µl Antikörper
- 5174,4 µl 1x Diluent N

#### 1x SP Conjugat

- 48 µl 100x Streptavidin-Peroxidase Conjugat
- 4752 µl 1x Diluent N

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

#### *2.2.1.1 Verwendete Zelllinien*

Verwendung fanden zwei Zelllinien: Die Hepatoma-Zellen HepG2 und die Mausmakrophagen-Zelllinie RAW264.7.

Die HepG2-Zellen wurden im oben angegeben DMEM, versetzt mit 10% FCS, 1%

Penicillin/Streptomycin, 1% MEM, 1% L-Glutamin und 0,4 mg/ml G418, kultiviert, die RAW264.7-Zellen im angegebenen RPMI, versetzt mit 5% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin. Beide Zelllinien wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gezüchtet.

#### *2.2.1.2 Subkultivieren und Aussäen der Zellen*

Die Zellen wurden wöchentlich zweimal subkultiviert. Dafür wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, um dann je Flasche 4 ml Trypsin hinzuzugeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Zellen, welche sich noch nicht vom Flaschenboden gelöst haben, durch leichtes Klopfen gegen den Flaschenrand gelöst. Die Trypsinreaktion wurde daraufhin mit 4 ml des jeweiligen FCS-haltigen Mediums gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt und bei 300 g für 5 min abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt und verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert und daraus wurde je nach Split-Verhältnis (HepG2 1:3, RAW 1:8) die entsprechende Menge in eine neue Kulturflasche mit 10 ml des entsprechenden Mediums gegeben.

#### *2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl*

Zur Bestimmung der für die Aussaat benötigten Zellzahl wurden, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, die Zellen subkultiviert, abzentrifugiert und in 1 ml Medium resuspendiert. Aus dieser Lösung wurden 10 µl auf 90 µl 0,2% Trypanblau gegeben und gemischt. 10 µl aus dieser Lösung wurden wiederum auf eine Zählkammer gegeben und am Mikroskop ausgezählt.

Für die jeweiligen Versuche wurden die Zellen auf 6-Well-Platten ausgesät – HepG2 mit  $5 \times 10^5$  Zellen pro Well und RAW264.7 mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro Well.

#### *2.2.1.4 Stimulation und Zellernte*

Einen Tag nach Aussaat wurde auf FCS-freies Medium gewechselt und wiederum nach 24 h wurden die Zellen mit entsprechenden Konzentrationen an Stimulatoren versetzt (s. dazu Tabelle 3) oder im Medium belassen.

Zu dem Versuch entsprechenden Zeitpunkt wurde der Überstand aus den Wells entfernt, Zellen wurden mit PBS gewaschen und für die RNA-Ernte wurde pro Well 350 µl des Proteinase K Puffers zugegeben. Für die Proteinernte wurden 75 µl der Lösung aus 10 ml RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitor und PhosphoSTOP auf jedes Well

gegeben. Mittels eines Zellschabers wurden die Zellen von der Well-Platte gelöst und die Zell-Ernte-Puffer-Lösung gesammelt. Dieses Gemisch wurde in ein entsprechendes Eppendorf-Cup überführt und entsprechend weiterverarbeitet.

Tabelle 5: Eingesetzte Konzentrationen und Vorinkubationszeiten verwendeter Substanzen.

Substanzname	Einsatz-Konzentration	Vorinkubationszeit [h]
AG1478	200 nM - 1 $\mu$ M	0,5
ALR	100 ng/ml Für Konzentrationsreihe: 10 - 500 ng/ml	2
IL-6	25 ng/ml	-
LPS	100 ng/ml	-
MG-132	1 - 10 $\mu$ M	1
PD98059	10 $\mu$ M	1
PmB	50 U/ml	-
SB203580	10 $\mu$ M	1

### 2.2.2 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurde das Qiagen RNeasy mini Kit verwendet.

Die vorher in ein Eppendorf-Cup überführten, geernteten Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer 20G-Nadel homogenisiert. Danach wurde eine adäquate Menge 70%iger Ethanol hinzugegeben und gemischt. Je 700  $\mu$ l dieser Lösung wurden auf eine RNeasy-Säule gegeben und bei 8000g für 30 sec zentrifugiert. Enthielt die Ausgangslösung mehr als 700  $\mu$ l, so wurde dieser Schritt entsprechend oft wiederholt. Das "*Flowthrough*" wurde verworfen und es wurden 350  $\mu$ l RW1-Puffer auf die Säule gegeben und diese wiederum bei 8000g für 30 sec zentrifugiert. Darauf wurde die Säule 15 min lang mit 80  $\mu$ l einer DNase-Lösung behandelt (10  $\mu$ l DNase und 70  $\mu$ l RDD-Puffer aus dem Rnase-Free Dnase Set). Nach einem weiteren Waschschritt mit einem RW1-Puffer (s. oben) wurden 500  $\mu$ l des RPE-Puffers auf die Säule gegeben und diese bei 8000g für 30 sec abzentrifugiert. Der Flowthrough wurde verworfen und es wurden nochmals 500  $\mu$ l RPE-Puffer auf die Säule gegeben und diese nun bei 8000g für 2 min abzentrifugiert. Nach diesem Schritt wurde das Sammelgefäß verworfen und die Säule auf eine neues Sammelgefäß gesetzt und dann bei ca. 10000g für 1 min zentrifugiert. Flowthrouh und Sammelgefäß wurden wieder verworfen und die Säule wurde auf ein neues Eppendorf-Cup gesetzt. Danach wurde 30  $\mu$ l RNase-free water auf die Säule pipettiert und diese bei Raumtemperatur für 2 min inkubiert, um sie danach 1 min bei 8000g zu zentrifu-

gieren.

Die eluierte RNA-Mengen wurden dann mittels Nanodrop (je 1,5 µl) gemessen. Die RNA wurde dann in einem -80°C Kühlschrank verwahrt.

### **2.2.3 Reverse Transkription der isolierten RNA**

Zur Reversen Transkription wurde der QuantiTec Reverse Transcription Kit verwendet.

Pro Probe wurden jeweils 1 oder 2 µg umgeschrieben. Im Folgenden beziehen sich alle Angaben auf 1 µg. Wurde die doppelte Menge umgeschrieben, so wurden entsprechend alle Reagenzien in doppelter Menge eingesetzt.

Es wurde das entsprechende Volumen der benötigten RNA-Lösung berechnet und diese Menge mit 2 µl Wipeout Buffer vermischt und mit RNase free water auf 14 µl aufgefüllt. Danach wurden die Proben im Thermocycler für 2 min bei 42°C inkubiert. Daraufhin wurde ein Master-Mix, bestehend aus 1 µl Reverser Transkriptase, 1 µl RT Buffer, 4 µl Primer Mix pro Probe, hinzugegeben, um diese Lösung dann für 15 min bei 42°C und danach 3 min bei 95°C im Thermocycler zu inkubieren. Im Anschluss wurde die Probe auf 4°C abgekühlt.

Falls die Proben für eine RT-PCR-Messung verwendet wurden, wurden sie 1:2 mit Wasser verdünnt.

Die gewonnene cDNA wurde in einem -20°C Kühlschrank aufbewahrt.

### **2.2.4 RT-PCR**

Für die RT-PCR wurde das LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit verwendet. Die cDNA wurde mit einer Menge von je 25 ng eingesetzt. Die Proben wurden jeweils in Triplikaten gemessen. Das Endvolumen der Messung belief sich auf 20 µl, worin 1µl cDNA enthalten war. Pro Probe wurden 10 µl SYBR-Green, 7 µl Wasser (aus Kit) und je 1 µl des Sense- und Antisense-Primers eingesetzt.

Das Programm startete mit einem Zyklus bei 95°C für 10 min, um von 50 Zyklen mit 95°C für 15 sec, für 5 sec bei der den Primern entsprechenden Temperatur und 10 sec bei 72°C gefolgt zu werden.

Die Schmelzkurve wurde zur Überprüfung der Qualität des Amplikons analysiert. Eine Kontrolle ohne Probenmaterial (cDNA) wurde mitgeführt. Die Ergebnisse wurden mit der LightCycler Software Version 1.5 ausgewertet. Die Steigung einer mitgeführten Standardkurve wurde als Effizienz herangezogen. Die Standardkurve diente auch

als Bezug für die jeweiligen Konzentrationen der einzelnen Proben. Die Berechnung der Expressionsunterschiede erfolgte mittels  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode.

### **2.2.5 Statistische Analyse der RT-PCR-Ergebnisse**

Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mittels Microsoft Excel vorgenommen. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von insgesamt drei Wiederholungen. Als "Housekeeper"-Gen diente bei den Analysen der HepG2-Zellen HPRT, bei den RAW-Zellen Actin. Die jeweiligen Werte wurden in Relation zu einer mitgeführten, unbehandelten Kontrolle gesetzt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der Student's T-Test verwandt. Eine Signifikanz wird ab einem p-Wert  $< 0,05$  angenommen. Zur Erstellung der Graphen wurde die SigmaPlot-Software verwandt.

### **2.2.6 Protein-Isolation**

Zur Protein-Isolation wurde das wie unter 2.2.1.4 beschriebene Zelllysat gevortext, um ein Homogenat herzustellen. Danach wurde das Lysat bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 14.000 rpm für 20 min zentrifugiert. Die Zellrückstände lagern sich dabei als "Pellet" ab, im Überstand befindet sich dann das solubilisierete Protein. Dieser Überstand wurde in eine neues Eppendorf-Cup überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **2.2.7 BCA-Test zur Proteinkonzentrationsbestimmung**

Von den gewonnenen Proteinproben wurde je eine 1:20-Verdünnung erstellt. Die BCA-Reagenzien A und B wurden in einem Verhältnis von A:B = 1:50 angesetzt. Ein Albumin-Standard zur Konzentrationsbestimmung in den Stufen 0 - 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1 mg/ml wurde mitgeführt. 10  $\mu\text{l}$  der Proteinproben wurden mit je 200  $\mu\text{l}$  BCA-Reagenz-Mischung in die Wells einer 96-well-Platte gegeben (in Triplikaten vermessen). Die Platte wurde mit einer Folie abgedeckt und für 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurde mithilfe des Tecan Readers eine Absorptionsmessung der Proben bei 560 nm vorgenommen und mit der Magellan-Software ausgewertet.

### **2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung der Proteinproben nach deren Molekülgröße wurde eine SDS-Page durchgeführt.

Von den Proteinproben wurden 20  $\mu\text{g}$  in ein Eppendorf-Cup überführt und auf 5  $\mu\text{l}$  mit 50 mM Tris aufgefüllt. Zur Reduktion wurden 5  $\mu\text{l}$  eines mit 100 nM DTT versetzten Laemmli-Puffers hinzugegeben und bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 10 min inkubiert.

Die SDS-Gele wurden in das vorgesehene Kammersystem gegeben und mit dem beschriebenen 10% SDS-Laufpuffer befüllt. Luftblasen in den Taschen des SDS-Geles wurden mittels der Mikrodosierspritze (Hamilton) entfernt. Daraufhin wurden 5 µl eines Protein-Markers (Page Ruler Prestained Protein Ladder) zur späteren Größenbestimmung in eine Tasche jedes Gels pipettiert. Nach Proben-Hinzugabe wurde das Gel für 10 min bei 120 V laufen gelassen, danach für die Bestimmung der STAT3-Proteine für 50 min, der Erk1/2-Proteine für 40 min bei 200V. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus dem Kammersystem entfernt, aus der Haltevorrichtung herausgenommen und zur Weiterverarbeitung verwendet.

### **2.2.9 Western Blot**

Zur spezifischen Proteinidentifikation wurde ein Western Blot durchgeführt. Dazu wurden die zuvor mittels SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen.

Hierzu wurden Zuschnitte der Membran von der Größe 9 x 6,5 cm angefertigt. Auch 10 Blotpapiere pro Membran wurden zugeschnitten.

Die PVDF-Membran wurde für 5 min in Methanol getränkt, je vier Filter in Kathoden- oder Anoden B- und zwei in Anoden A-Puffer. Nach Befeuchtung der Anode des Semi-Dry Transfer Systems mit Anoden B-Puffer wurden die vier in Anoden B-Puffer getränkten Filterpapiere auf die Anode gelegt. Auf diese folgten die zwei Anoden A-Filterpapiere, die PVDF-Membran (das Methanol wurde zuvor noch in Anoden A-Puffer abgewaschen), das SDS-Gel und die Kathoden-Filter. Die Kathode wurde mit Kathoden-Puffer befeuchtet und aufgesetzt. Bei 23 V für 45 min wurde der Transfer der Proteine auf die Membran vollzogen. Dies wurde mittels einer Ponceau S Färbung kontrolliert. Hierzu wurde die Membran für 5 min mit einer Ponceau S-Lösung inkubiert bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Die Lösung wurde darauffolgend wieder abgenommen und die Membran mittels Wasser abgewaschen.

Danach wurden die freien Proteinplätze auf der Membran mittels einer Blocklösung (Milchpulver) blockiert (Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur). Bei in BSA gelösten Antikörpern folgten drei Waschschrte für je 5 min mit 1x TBST. Hierauf wurde die Membran mit den primären Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgten wieder drei Waschschrte mit 1x TBST und eine 1 h lange Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper. Nach drei weiteren Waschschrten mit 1x TBST wurde die Membran für 5 min mit den Chemilumineszenz-Reagenzien inku-

biert, welche unmittelbar vor Gebrauch in einem Verhältnis von 1:1 angesetzt wurden.

Die Entwicklung wurde mittels des ImageQuant LAS 4000 mini und der entsprechenden Software vorgenommen.

Wenn bei einer Membran mehrere Proteine untersucht werden sollten, welche noch dazu sehr ähnliche Größen besitzen (z.B. phosphoryliertes und unphosphoryliertes STAT3), musste zwischen den einzelnen Schritten ein sogenanntes "*Stripping*" durchgeführt werden. Dazu wurden die Membranen für 15 min bei Raumtemperatur mit 10 ml Re-Blot-Reagenz versetzt und danach zwei Waschschrte für 5min mit 1x TBST vorgenommen, worauf zweimal für 5 min mit 5% Milchpulverlösung geblockt wurde. Danach konnte eine zweite Inkubation mit einem primären Antikörper vorgenommen werden.

#### **2.2.10 Statistische Analyse der Western Blot Ergebnisse**

Die mit dem ImageQuant LAS 4000 mini entwickelten Bilder wurden mittels der Image J Software ausgewertet. Die Werte des jeweiligen phosphorylierten Proteins wurden zu den Werten des Gesamt-Proteins normalisiert. Die dargestellten Werte sind, falls nicht anders erwähnt, die Mittelwerte aus 3 Wiederholungen  $\pm$  SD. Die Signifikanzen wurden mittels dem Student's T-Test ausgewertet. Von signifikant wird bei  $p < 0,05$  gesprochen. Die Graphen wurden wieder mithilfe der SigmaPlot-Software erstellt.

#### **2.2.11 Gewinnung der Zellkultur-Überstände für die Vermessung mittels ELISA**

Nach 24 h wurden die Überstände vorsichtig von den Well-Platten abgenommen und in eine Eppendorf-Cup überführt. Diese Cups wurden für 10 min bei 3000g zentrifugiert. Eventuelle Rückstände aus der Zellkultur sammeln sich dabei auf dem Boden des Cups. Der daraus entstehende Überstand wurde wiederum in ein neues Cup überführt. Eine Lagerung fand bei  $-20^{\circ}\text{C}$  statt.

#### **2.2.12 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA**

Die Proteinkonzentrationen von Haptoglobin und Fibrinogen im Überstand wurden mittels ELISA vermessen. Dazu fanden die ELISA Kits von Abcam Verwendung. Neben den wie unter 2.1.8.3 beschriebenen Reagenzien, welche für beide Kits in gleicher Weise (lediglich unterschiedlicher Antikörper) angesetzt wurden, musste für jedes Protein ein entsprechender Standard angesetzt werden. Für Haptoglobin wa-

ren 1,6 µg Standard, für Fibrinogen 0,8 µg im Kit enthalten. Der Haptoglobin-Standard wurde in 4 ml 1x Diluent N zu einer 400 ng/ml Stock-Lösung, der Fibrinogen-Standard in 5 ml zu einer 160 ng/ml Stock-Lösung angesetzt. Danach konnte für beide gleich verfahren werden. 250 µl des Stocks wurden zu 250 µl 1x Diluent N gegeben. Es folgten sechs weitere Verdünnungsschritte aus je 120 µl der höheren Verdünnungsstufe in 120 µl 1x Diluent N. Als Nullwert wurden 120 µl 1x Diluent N in ein Cup überführt. So entstand für Haptoglobin die Standardreihe 0 - 3,125 - 6,25 - 12,5 - 25 - 50 - 100 - 200 ng/ml und für Fibrinogen 0 - 1,25 - 2,5 - 5 - 10 - 20 - 40 - 80 ng/ml. Im Weiteren wurde für beide Protein gleich verfahren:

Der Assay wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. 50 µl des Standards bzw. der Probe wurde in je ein Well der Microplatte gegeben. Die Wells der Platte wurden mit einer Sealing-Folie aus dem Kit verschlossen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten fünf Waschschriffe mittels 1x Wasch-Puffer. Hierzu wurden je 200 µl des Wasch-Puffers in ein Well gegeben. Durch Invertieren der Platte und vier- bis fünfmaliges Klopfen der Platte auf absorbierendes Papier wurde der Wasch-Puffer wieder entfernt. Nach diesen Waschschriffen folgte eine Inkubation für eine Stunde mit 50 µl pro Well des Antikörpers, worauf wieder fünf Waschschriffe folgten. Um das Signal sichtbar zu machen, mussten 50 µl des 1x Streptavidin Conjugates dazugegeben werden und für 30 Minuten inkubiert werden. Nach weiteren fünf Waschschriffen folgte eine 10-12 minütige Inkubation mit 50 µl Chromogen Substrat. Um für gute Durchmischung zu sorgen, wurde die Platte mehrmals leicht gegen eine Unterlage geklopft. Nachdem ein deutliches, blaues Signal erkennbar war, wurde die Reaktion mittels 50 µl Stop-Lösung angehalten.

Die Vermessung folgte unmittelbar im Anschluss bei 450 nm am Tecan-Reader und die Auswertung mittels der Magellan Software.

Die Proben wurden in Duplikaten und zwei Verdünnungsstufen (1:10 und 1:50 bei Haptoglobin, 1:20 und 1:100 bei Fibrinogen) vermessen. Die dargestellten Ergebnisse sind die Mittelwerte von drei Wiederholungen  $\pm$  SD. Eine Signifikanz wird bei  $p < 0,05$  angenommen. Auch hier erfolgte die Darstellung mittels Graphen anhand der SimgaPlot-Software.

### **3. Darstellung der eigenen Ergebnisse**

#### **3.1 Etablierung des IL-6- bzw. LPS-Zellkulturmodells**

##### **3.1.1 Etablierung des epithelialen Zellkulturmodells**

Für weitere Untersuchungen des Einflusses von ALRp auf die Expression von Akut-Phase-Proteine musste erst geklärt werden, welche Gene von den verwendeten Zelllinien exprimiert werden und welche Gene unter den gewählten Bedingungen der Regulation von IL-6 bzw. LPS unterliegen. Dazu wurden HepG2-Zellen, wie beschrieben, ausgesät und für 24 h mit 25 ng/ml IL-6 oder 100 ng/ml LPS inkubiert. Danach wurde die mRNA isoliert und mittels qRT-PCR quantitativ analysiert. Untersucht wurden die Gene  $\alpha$ 1Antitrypsin, Antithrombin 3, CTGF, CRP, Fibrinogen  $\beta$ , Haptoglobin, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, RBP4, SAA2 und TNF- $\alpha$ .

Von den Zytokinen konnte auch in den unbehandelten Proben der HepG2-Zellen keine mRNA-Expression von IL-6 und TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden. Eine Expression von IL-1 $\beta$  und IL-8 konnte zwar detektiert werden, unterlag unter den gewählten Bedingungen aber nicht der Regulation von IL-6 oder LPS.

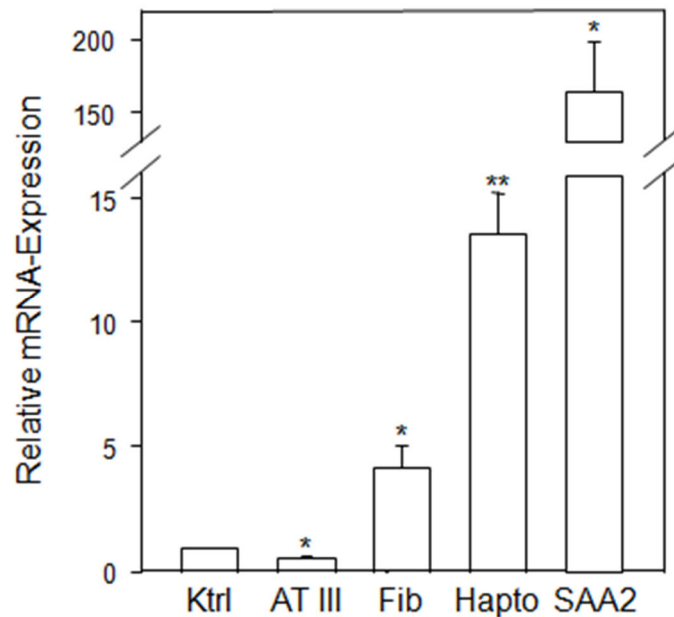
Eine mRNA-Expression des APPs CRP konnte in den HepG2-Zellen auch mit unterschiedlichen Primer-Paaren wiederholt nicht nachgewiesen werden - unabhängig vom Alter (von der Passage) der Zellen.

Von den restlichen APPs unterlagen unter den gewählten Bedingungen Fibrinogen  $\beta$ , Haptoglobin und SAA2 in den HepG2-Zellen einer messbaren Regulation durch IL-6, nicht jedoch durch LPS.

Von den negativen APPs konnte in HepG2-Zellen für AT III eine Änderung der mRNA-Expression nach IL-6-, jedoch nicht nach LPS-Inkubation gezeigt werden (s. Abbildung 10).

Festgehalten werden kann somit, dass sämtliche Gene nicht auf eine Stimulation mit LPS mit einer Änderung der mRNA-Expression reagieren.

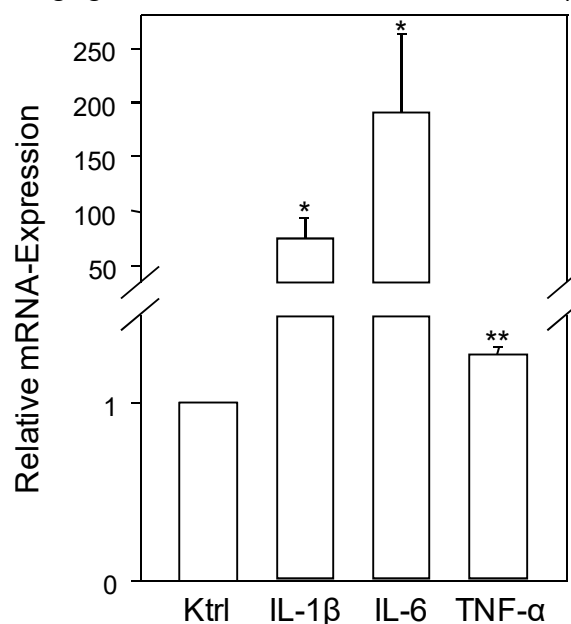
Von den APPs zeigen Fibrinogen  $\beta$ , Haptoglobin, SAA2 und AT III bei den gewählten Bedingungen - v.a. im Zeitfenster von 24 h - nach IL-6-Stimulation die erwartete Reaktion und können für weitere Untersuchungen herangezogen werden.



**Abbildung 10:** mRNA-Expression von APPs in HepG2 nach IL-6-Stimulation. Die HepG2-Zellen wurden für 24 h mit 25 ng/ml IL-6 inkubiert und dann mittels qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind hier die APPs die unter diesen Bedingungen mit einer signifikanten Änderung ihrer mRNA-Expression reagierten. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (vs. Kontrolle);  $n = 3$ .

### 3.1.2 Etablierung des monozytären Zellkulturmodells

Damit auch in den RAW 264.7-Zellen die mRNA-Expression der zu untersuchenden Gene überprüft werden konnte, wurde nach dem unter 3.1.1 erwähnten Schema vorgegangen. Zeitpunkte und Konzentrationen wurden hier in identischer Weise gewählt. Ausgewertet wurde die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ . Bei allen zeigte sich eine signifikante Änderung nach LPS-Stimulation im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle, hingegen nicht bei Stimulation mit IL-6 (s. Abbildung 11).



**Abbildung 11:** mRNA Expression von Zytokinen in RAW-Zellen nach LPS-Stimulation. RAW-

Zellen wurde für 24 h mit 100 ng/ml LPS inkubiert, danach wurde die RNA-Expression mittels qRT-PCR quantitativ analysiert. In allen drei Genen zeigte sich hierbei eine signifikante Änderung zur unbehandelten Kontrolle. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (vs. Kontrolle);  $n = 3$ .

## **3.2 Untersuchungen im monozytären Zellkulturmodell**

### **3.2.1 Zeitabhängigkeit der Zytokin-Expression**

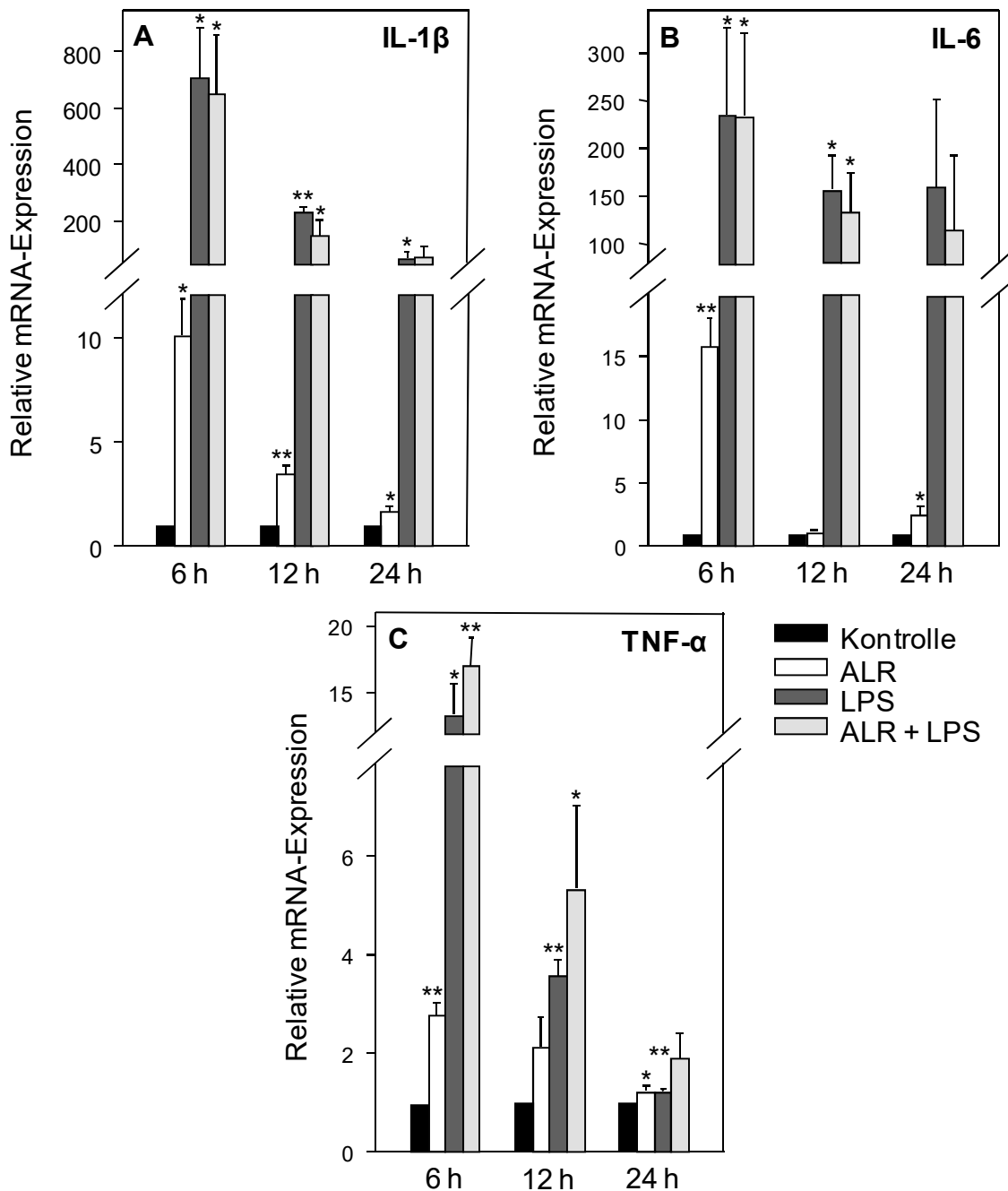
Der Einfluss von ALRp auf die Zytokin-Expression der Makrophagen-Zelllinie RAW und somit auf das Entzündungsgeschehen im Körper wurde zeitabhängig auf mRNA-Ebene untersucht. Dazu wurden RAW-Zellen mit 100 ng/ml LPS, 100 ng/ml ALRp oder der Kombination aus beiden inkubiert. Eine unbehandelte Kontrolle wurde mitgeführt. Die mit ALRp stimulierten Proben wurden für 2 h vor der LPS-Stimulation mit je 100 ng/ml ALRp vorinkubiert. Nach 6, 12 und 24 h wurde die mRNA geerntet und mittels qRT-PCR quantitativ analysiert.

Es zeigte sich im Verlauf für alle drei Zytokine ein ähnliches Schema. So konnte für IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  eine maximale Erhöhung der mRNA-Expression nach Stimulation mit LPS bei 6 h gemessen werden, welche nach 12 und viel mehr nach 24 h deutlich verringert war, bei TNF- $\alpha$  nach 24 h annähernd den Ausgangswert erreicht hat. Bei IL-6 fallen im Vergleich zu den anderen beiden Zytokinen größere Schwankungen in der mRNA-Expression der einzelnen Versuche auf (s. Abbildung 12).

Vergleicht man die Reaktion zwischen LPS und der Kombination aus LPS und ALRp, so kann man bei allen drei Genen keine Unterschiede in der Expression erkennen, die Änderungen sind bei beiden Bedingungen etwa auf dem gleichen Niveau, signifikante Unterschiede gibt es hier keine (s. Abbildung 12).

Bei der Stimulation mit ALRp allein verhält es sich hingegen anders. Die durch ALRp alleine erzeugte Änderung der mRNA-Expression ist viel geringer als die durch LPS. Der zeitliche Verlauf ist jedoch an die Beobachtungen bei LPS alleine angelehnt: Bei 6 h führt ALRp zur stärksten mRNA-Expressionsänderung, welche nach 12 und 24 h geringer ist (s. Abbildung 12).

Stellt man einen Vergleich der Änderung der mRNA-Expression auf ALRp- bzw. LPS-Stimulation alleine an, stellt man fest, dass die Expressionsänderung bei LPS-Stimulation alleine deutlich stärker ist - im Bereich zwischen zehn - bis 80-fach - als auf ALRp alleine. Dies wird durch ein fehlende zusätzliche Steigerung der mRNA-Expression der Zytokinen bei der Kombination aus beiden Substanzen bestätigt (s. Abbildung 12).



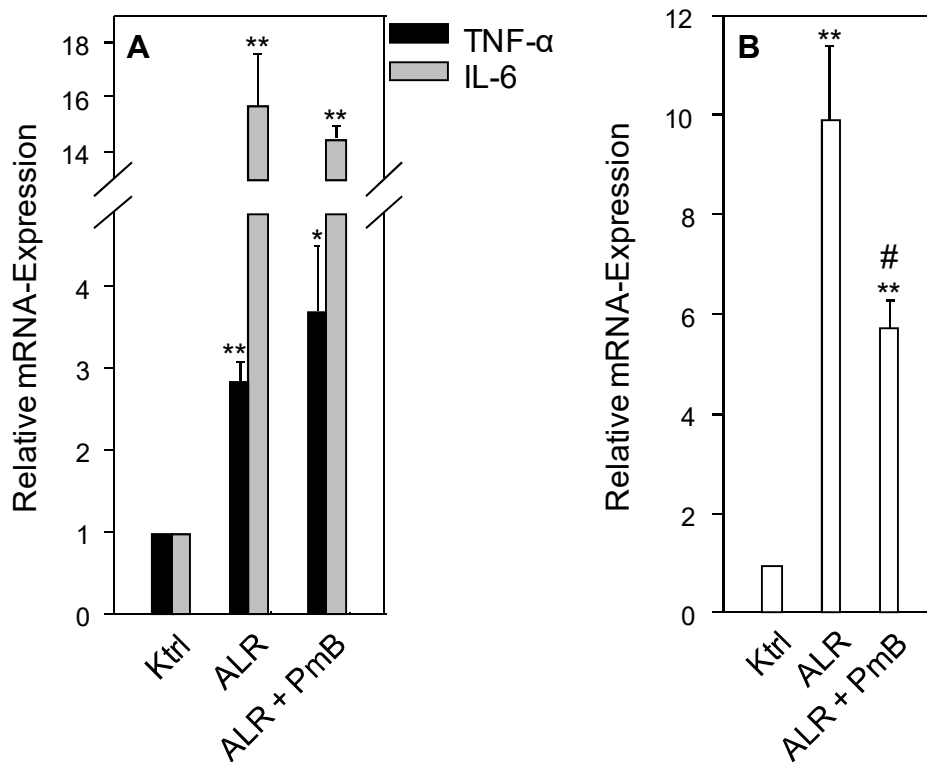
**Abbildung 12:** Zeitabhängigkeit der Zytokin-Expression in RAW-Zellen. Abgebildet sind die für 6, 12 und 24 h analysierten jeweiligen relativen mRNA-Expressionen der Zytokin-Gene IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B) und TNF- $\alpha$  (C). Die Stimulation erfolgte jeweils mit 100 ng/ml ALRp und/oder 100 ng/ml LPS. \*  $p < 0,5$ , \*\*  $p < 0,01$  (vs. Kontrolle);  $n = 3$ .

### **3.2.2 Kontrolle der Ergebnisse der Zytokin-Stimulation - Ausschluss von LPS-Kontamination des rekombinanten Proteins**

LPS-Verunreinigungen können bei der Präparation von rekombinantem Protein aus BL21 Bakterien auftreten. Spuren von LPS im angewandten, in Bakterienkultur rekombinant hergestelltem ALRp könnten zu einer Änderung der mRNA-Expression der analysierten Gene führen und somit ist der Einfluss von ALRp auf die Expressionsänderung nicht ohne Vorbehalt zu beurteilen. Da, wie unter 3.2.1 gezeigt, das monozytäre Zellmodell sehr sensibel auf LPS-Inkubation reagiert - bei dem epithelialen Modell konnte gezeigt werden, dass LPS keinen Einfluss auf die Expression der APPs besitzt (s. dazu 3.1.1) -, ist es von Bedeutung, zu differenzieren, ob die mRNA-Expressionsänderung von LPS-Rückständen oder tatsächlich von ALRp selbst verursacht wird. Deswegen wurde ein gängiger LPS-Inhibitor, Polymyxin B, verwendet, mit welchem eine derartige Differenzierung möglich ist (Cardoso 2007). So wurden die RAW 264.7 - Zellen für 6 h entweder mit 100 ng/ml ALRp oder mit 100 ng/ml ALRp plus 50 U/ml PmB inkubiert (wie üblich nach 2 h Vorinkubation). Eine unbehandelte Kontrolle wurde mitgeführt. Nach 6 h wurde die RNA geerntet, isoliert und mittels qRT-PCR analysiert.

Es zeigte sich bei den Genen TNF- $\alpha$  und IL-6, dass eine mögliche LPS-Verunreinigung keinen Einfluss auf die von ALRp induzierte Expressionsänderung besitzt, da auch die Zugabe von PmB zu keinen signifikanten Unterschieden der mRNA-Expression führte.

Bei IL-1 $\beta$  stellt sich der Sachverhalt etwas anders dar. Mit PmB zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Expression bei ALRp plus PmB im Vergleich zu ALRp allein. Dies legt nahe, dass der Einfluss einer potentiellen LPS-Verunreinigung auf die mRNA-Expressionsänderung von IL-1 $\beta$  nicht sicher auszuschließen ist. Jedoch zeigte sich auch bei Zugabe von 50 U/ml PmB zu ALRp im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle noch eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression (s. Abbildung 13).



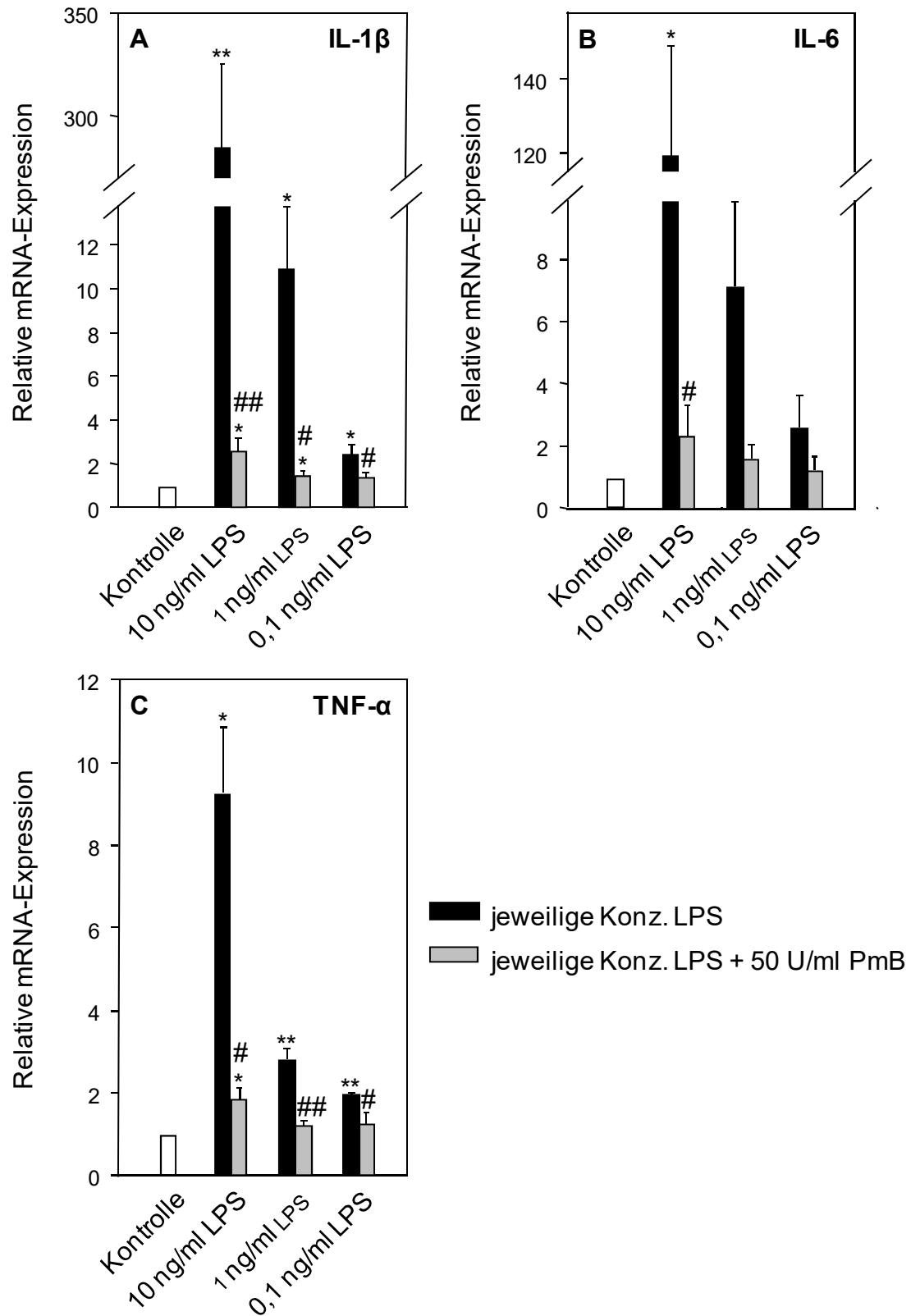
**Abbildung 13:** Überprüfung von LPS-Verunreinigungen im rekombinantem ALRp. Nach 6 h Inkubation mit 100 ng/ml ALR oder der Kombination aus 100 ng/ml ALRp und 50 U/ml PmB zeigte sich bei IL-6 und TNF- $\alpha$  (A) keine Änderungen bzgl. des Niveaus der Reaktion auf ALR. Bei IL-1 $\beta$  (B) hingegen konnte eine signifikant geringere mRNA-Expression festgestellt werden, welche jedoch noch immer zur Kontrolle eindeutig erhöht war. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (vs. Kontrolle); #  $p < 0,05$  (vs. ALR);  $n = 3$ .

Damit eine Interpretation der Reaktionen auf PmB, vor allem des Unterschiedes bei IL-1 $\beta$ , überhaupt möglich ist, wurde in einem weiteren Versuch untersucht, welche Menge an LPS durch PmB inhibiert werden kann. So wurden RAW-Zellen mit den Konzentrationen von 10, 1 und 0,1 ng/ml LPS einmal alleine und einmal in Kombination mit 50 U/ml PmB für je 6 h inkubiert, danach geerntet und die mRNA mittels RT-PCR analysiert.

Auf 10 ng/ml LPS zeigten die RAW-Zellen in allen Genen eine deutliche Reaktion, welche bei 1 und bei 0,1 ng/ml wesentlich schwächer, aber dennoch teils signifikant ausfiel. Generell gilt auch hier die oben schon angemerkte Tatsache, dass die Werte von IL-6 zwischen den einzelnen Versuchen am stärksten schwankten, der Fehler hier also am größten ist. Dies erklärt die teils fehlenden Signifikanzen im Vergleich zu den anderen Zytokinen. So kommt es zustande, dass bei der geringsten Konzentrationsstufe, also 0,1 ng/ml LPS, IL-6 nicht mehr, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  aber mit einer signifikanten mRNA-Expressionserhöhung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reagierten (s. Abbildung 14).

Bei allen Genen stellt man hingegen eine deutliche Reduktion der Zytokin-Antwort nach LPS-Stimulation bei PmB-Zugabe fest. So verringert die Zugabe von 50 U/ml PmB die Antwort auf 10 ng/ml LPS bei allen Genen wesentlich. Bei IL-1 $\beta$  kann eine Verringerung auf weniger als 1% im Vergleich zur Ausgangsreaktion beobachtet werden, auch IL-6 reagiert mit einer ähnlichen Verringerung. Bei den geringeren Konzentrationsstufen sind 50 U/ml PmB sogar in der Lage, den Effekt von LPS vollständig zu unterbinden.

Angemerkt soll aber an dieser Stelle ebenfalls noch werden, dass es bei Konzentrationen, welche für eine Verunreinigung von rekombinant hergestelltem Protein in Betracht kämen (0,1 ng/ml), bei keinem der drei Gene zu einer Erhöhung der mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle um mehr als dreifach kommt (s. Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Inhibition der Zytokin-Antwort auf LPS durch PmB-Zugabe. Durch Zusatz von 50 U/ml PmB zu den Konzentrationen von 10, 1 und 0,1 ng/ml LPS wird bei allen drei untersuchten Zytokinen - IL1 $\beta$  (A), IL-6 (B) und TNF- $\alpha$  (C) - eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression bei allen gewählten Konzentrationen von LPS beobachtet. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (vs. Kontrolle); #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  (vs. jeweilige Konzentrationen an LPS);  $n = 3$ .

### **3.2.3 Inhibition spezifischer Signalwege in RAW-Zellen zur Untersuchung eines potentiellen Wirkmechanismus von ALR**

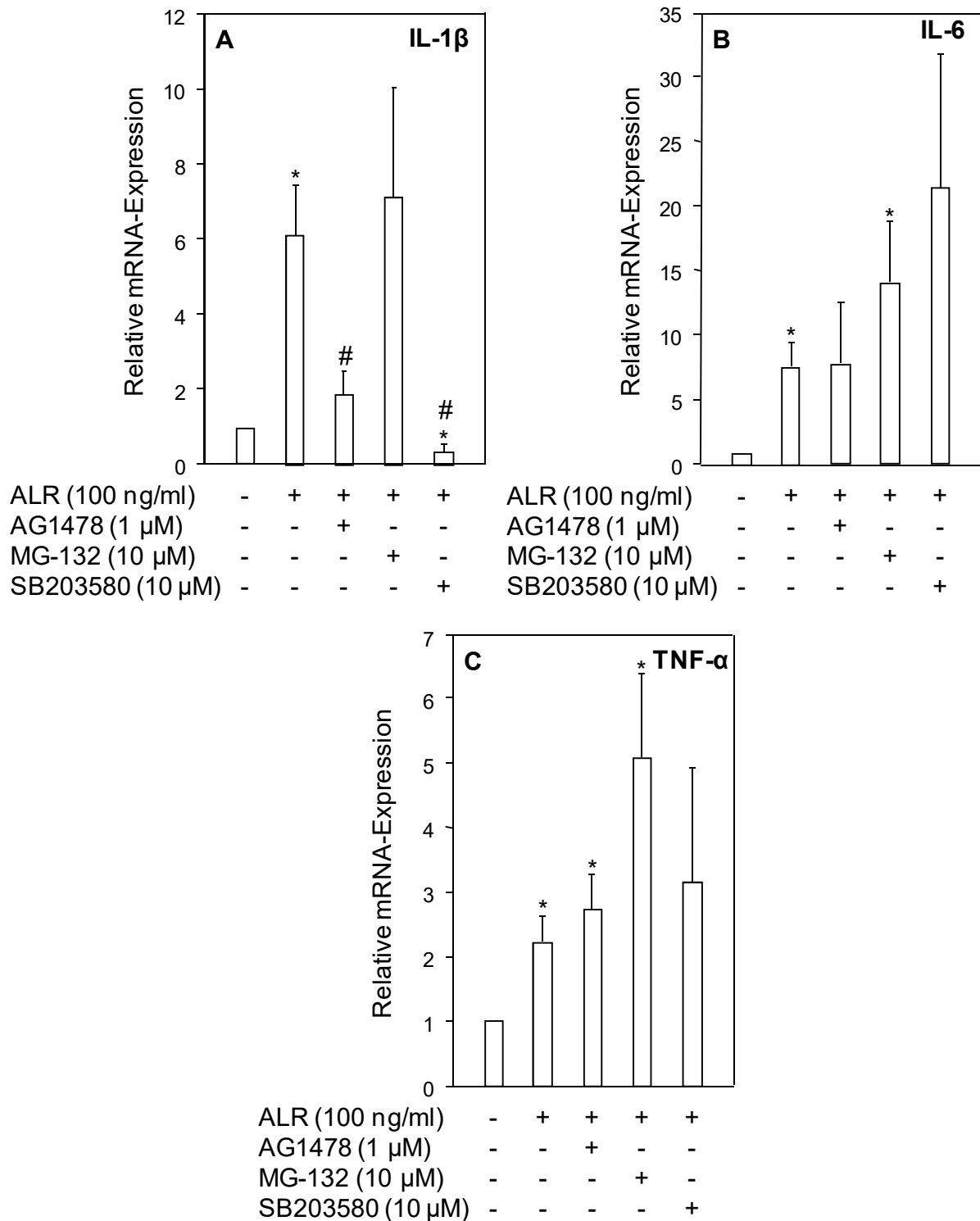
Da es bereits Untersuchungen bezüglich der Wirkung von ALR auf einzelne Signalkaskaden und entsprechender Zytokin-Antwort in Kupffer-Zellen gibt, in welchen p38-MAPK und NF $\kappa$ B als Wirkmechanismen des ALR-Effektes identifiziert wurden (Gandhi 2010), ist es auch von Interesse, ob dies in ähnlicher Weise auf die RAW-Zellen, einer nicht-gewebsständige Mausmakrophagen-Zelllinie, zutrifft.

Zu diesem Zweck wurden die Inhibitoren MG-132 (zur Inhibition von NF $\kappa$ B) mit der Konzentration 10  $\mu$ M, SB203580 (für p38-MAPK) ebenfalls in der Konzentration 10  $\mu$ M - beide Konzentrationen parallel zu Gandhi 2010 - und AG1478 (für EGFR) in der Konzentration von 1  $\mu$ M eingesetzt - analog zu den Erkenntnissen aus 3.3.4. Letzter Inhibitor fand Verwendung, um zu überprüfen, ob die EGFR-Tyrosinkinaseaktivität auch in Makrophagen zur Signaltransduktion von ALRp beiträgt. Eingesetzt wurden die Inhibitoren zu den unter 2.2.1.4 angegebenen Vorinkubationszeiten. Die Zellen wurden in Folge mit ALR stimuliert und nach 6 h geerntet. Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte mittels RT-PCR.

Bei IL-6 und TNF- $\alpha$  konnte bei keinem der drei verwendeten Inhibitoren ein Effekt beobachtet werden. Keiner der Inhibitoren war in der Lage, den Effekt von ALRp signifikant abzuschwächen. Jedoch zeigten die Werte bei Stimulation mit Inhibitoren große Schwankungen.

Bei IL-1 $\beta$  ist ein anderer Sachverhalt zu beobachten. So zeigte eine Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase eine Reduktion der Induktion der Zytokin-Produktion durch ALRp auf 30% des ursprünglichen Signals. Der NF $\kappa$ B-Inhibitor war, entgegen dem Ergebnis von Gandhi 2010 in Kupffer-Zellen, hierzu nicht in der Lage. Der p38-MAPK-Inhibitor SB203580 war aber in der Lage, die Reaktion auf die ALR-Stimulation deutlich zu reduzieren. Sie sank unter den Vergleichswert der unstimulierten Kontrolle.

Man kann also zusammenfassend festhalten, dass die Inhibition der Signalwege bei den Genen IL-6 und TNF- $\alpha$  keine Änderungen hervorrief, bei IL-1 $\beta$  bei Inhibition der Signalwege der MAPK und der EGFR-Tyrosinkinase hingegen eine signifikante Reduktion der durch ALR vermittelten mRNA-Expressionsänderung gemessen wurde (s. Abbildung 15).



**Abbildung 15 :** Inhibition einzelner Signalwege von ALR in RAW-Zellen. Die angegebenen Inhibitoren wurden unter den unter 2.2.1.4 Vorinkubationszeiten eingesetzt. Danach erfolgte die Stimulation mit 100 ng/ml ALRp und die Zellernte nach 6 h. Analysiert wurden die Gene IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B) und TNF- $\alpha$  (C). AG1478 inhibiert die EGFR-Tyrosinkinase, MG-132 NF $\kappa$ B und SB203580 die p38-MAPK.

Nur bei IL-1 $\beta$  zeigte sich ein Effekt von AG1478 und SB203580. \*  $p < 0,05$  (vs. Kontrolle); #  $p < 0,05$  (vs. 100 ng/ml ALR);  $n = 3$ .

### 3.3 Untersuchungen im epithelialen Zellkulturmodell

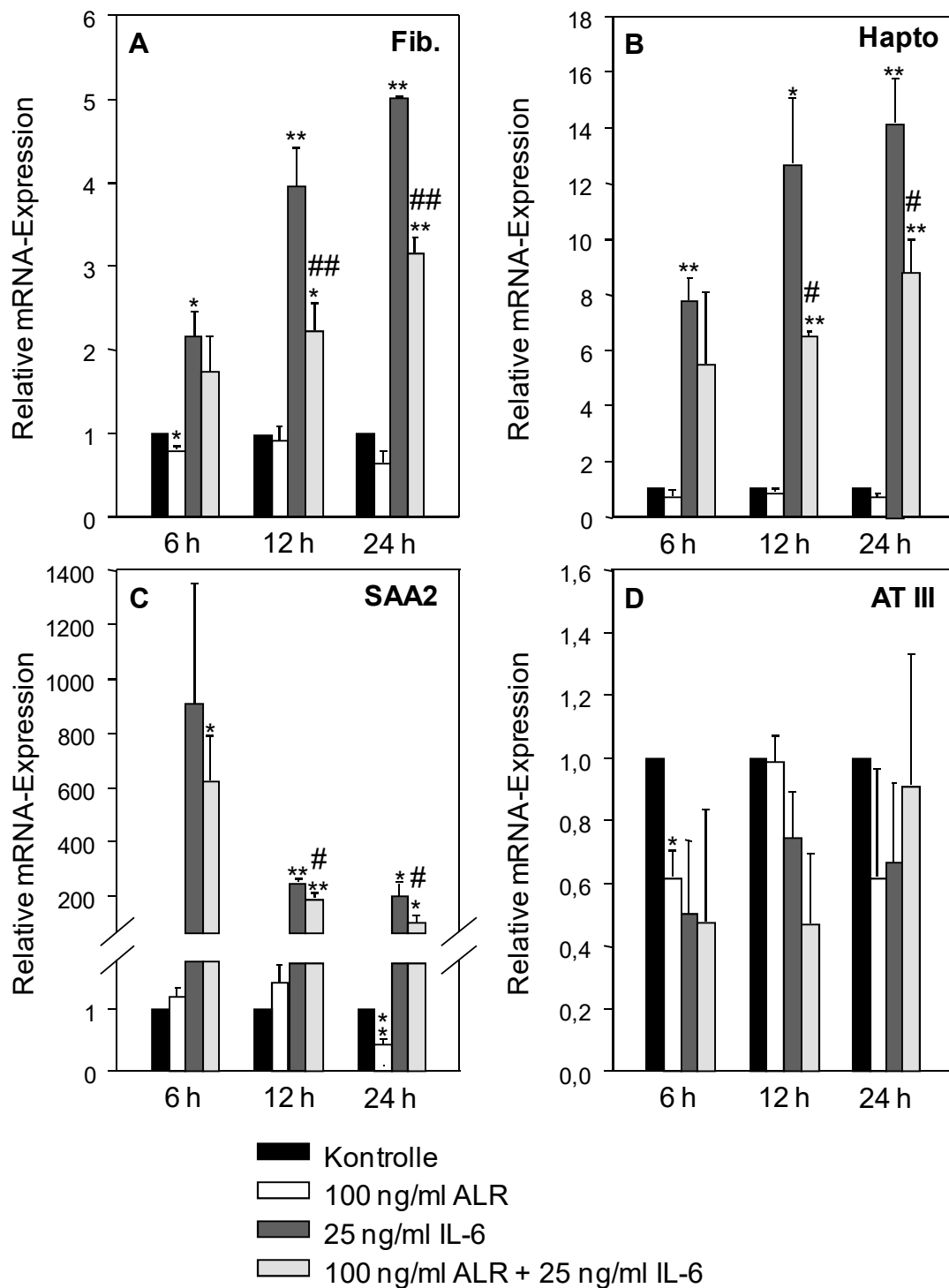
#### 3.3.1 Zeitabhängigkeit der APP-Expression und des Einflusses von ALR

Um zu zeigen, ob es einen Einfluss von ALR auf die APP-Expression im epithelialen Zellmodell gibt und ob dieser einer Zeitabhängigkeit unterliegt, wurden vier Bedingungen untersucht: Kontrolle (unbehandelt), Stimulation mit 25 ng/ml IL-6, Stimulation mit 100 ng/ml ALRp, Stimulation mit 100 ng/ml ALRp und 25ng/ml IL-6. Diejenigen Proben, welche mit ALRp oder der Kombination von ALRp und IL-6 stimuliert wurden, wurden für 2 h mit 100 ng/ml ALRp vorinkubiert. Die Zellen wurden nach 6, 12 und 24 h geerntet und die mRNA-Expression mittels RT-PCR analysiert.

Untersucht wurden die Gene SAA2, Fibrinogen  $\beta$ , Haptoglobin als Vertreter positiver APPs und Antithrombin III als Vertreter eines negativen APP in der Zelllinie HepG2. Bei AT III konnte entgegen der Positivkontrolle im weiteren Verlauf der Arbeit aber keine konstante Reaktion auf IL-6 beobachtet werden. Auch auf ALRp konnte keine eindeutige Reaktion ausgemacht werden.

Die anderen untersuchten Gene reagierten alle bereits nach 6 h mit einer signifikanten Reaktion auf IL-6. Fibrinogen  $\beta$  zeigte nach 24 h die stärkste Reaktion mit einer fünffachen Erhöhung der mRNA-Expression. Haptoglobin zeigte einen ähnlichen zeitlichen Verlauf; So konnten auch hier nach 24 h die höchsten Werte gemessen werden. Es wurden maximale Werte im Bereich von zehn- bis 15-facher Erhöhung der mRNA-Expression beobachtet. SAA2 zeigte einen etwas anderen zeitlichen Verlauf. So fand sich hier die stärkste Erhöhung nach 6 h, welche nach 12 und 24 h bereits niedriger war, jedoch noch immer im Bereich einer 200-fachen Erhöhung der mRNA-Expression.

Auf die Stimulation mit IL-6 plus ALRp reagierten alle drei Gene mit einer gleichsinnigen Änderung der mRNA-Expression. Nach 6 h konnte man erste Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen der Stimulation mit ALR und der Kombination von ALR und IL-6 beobachten, welche noch keine Signifikanz besaßen. Nach 12 und 24 h konnte dann aber eine signifikante Erniedrigung um 30% der mRNA-Expression in den Zellen mit der Kombination von IL-6 plus ALRp im Vergleich zu IL-6 allein bei den Genen von Haptoglobin (von 14- auf neunfach) und Fibrinogen  $\beta$  (von fünf- auf dreifach) gezeigt werden. Bei SAA2 (von 200- auf 100-fach) beobachtet man nach 24 h sogar eine Reduktion um 50%. ALRp alleine zeigte keine in- oder reduktiven Effekt auf die mRNA-Expression aller untersuchten Gene (s. Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Zeitabhängigkeit der APP-mRNA-Expression und des Einflusses von ALRp. Nach Inkubation der HepG2-Zellen mit den angegebenen Konzentrationen wurden die Zellen nach 6, 12 und 24 h geerntet und die Gene Fibrinogen  $\beta$  (A), Haptoglobin (B), SAA2 (C) und AT III (D) mittels RT-PCR analysiert. Bei allen drei positiven APPs zeigte sich eine signifikante Erniedrigung des IL-6-Effektes durch ALR. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (vs. Kontrolle); #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  (vs. IL-6);  $n = 3$ .

### **3.3.2 Änderung der APP-mRNA-Expression in Abhängigkeit der ALR-Konzentration**

Im Weiteren wurde ebenfalls in HepG2-Zellen die Konzentrationsabhängigkeit des ALR-Effektes auf die IL-6-Antwort untersucht. Hierzu wurden die Konzentrationen von 10, 50, 100, 250 und 500 ng/ml ALRp in Kombination mit 25 ng/ml IL-6 gewählt und Proben mitgeführt, welche nur mit 25 ng/ml IL-6 stimuliert wurden, ebenso wie eine unbehandelte Kontrolle. Die RNA wurde nach 12 h geerntet und die Werte in Relation zur Kontrolle betrachtet.

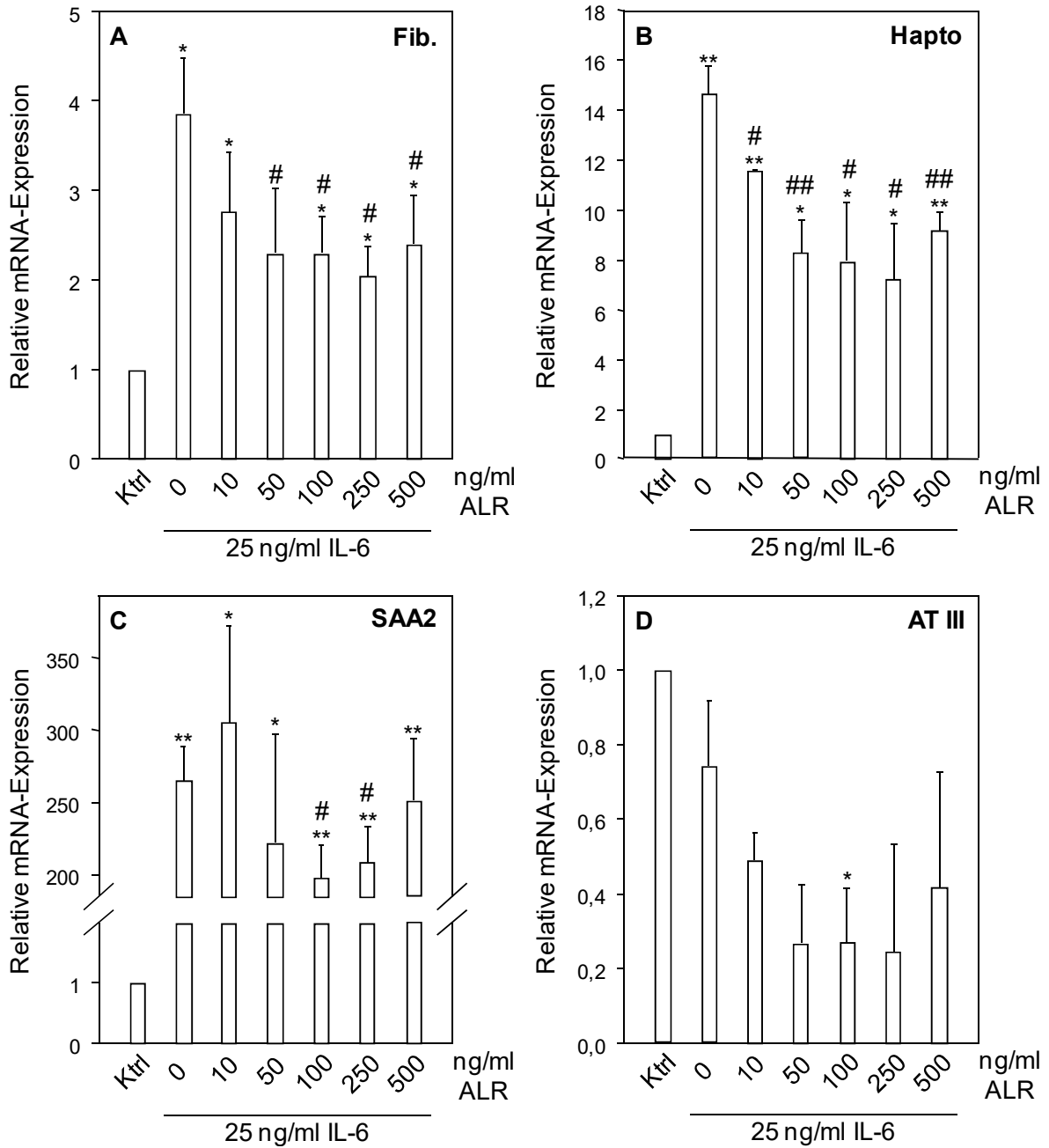
Der Zeitpunkt von 12 h wurde gewählt, da es hier bei zwei der drei untersuchten Gene, deren mRNA-Expressionsänderung nach IL-6-Stimulation durch ALRp bei 3.3.1 beeinflusst wurde, zur stärksten Reduktion der mRNA-Expressionserhöhung nach ALR-Zugabe zu mit IL-6-stimulierten HepG2-Zellen kam.

Es zeigte sich im Versuchsverlauf für die Gene Fibrinogen und Haptoglobin ein ähnliches Schema. Bereits bei 10 ng/ml ALRp konnte für das Gen Haptoglobin und bei 50 ng/ml für das Gen Fibrinogen eine signifikante Reduktion des IL-6-Signals beobachtet werden. Eine Änderung der APP-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der ALRp-Konzentration konnte für diese beiden Gene nicht beobachtet werden.

Etwas anders verhält es sich bei SAA2. 10 und auch 50 ng/ml ALRp konnten hier zu keiner signifikanten Reduktion des IL-6-Signals beitragen. Auch bei 500 ng/ml konnte keine signifikante Erniedrigung mehr gesehen werden. So liegt bei diesem Gen das Wirkoptimum bei 100 bzw. 250 ng/ml ALRp. Ein Unterschied zwischen diesen beiden Konzentrationen besteht nicht.

Um nun den optimalen Bereich der Wirkung von ALR festzulegen, muss man alle drei APPs miteinander in einen Kontext setzen. Die Konzentrationen 100 ng/ml und 250 ng/ml ALRp in Kombination mit 25 ng/ml IL-6 führten in allen drei Genen zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression im Vergleich zu IL-6 alleine. Somit liegt das Wirkoptimum in diesem Bereich. Eine stärkere Reduktion als mit 100 ng/ml ALRp konnte durch keine andere Konzentration erzielt werden.

Anzumerken ist abschließend, dass auch bei diesen Versuche das negative APP AT III keine eindeutigen Ergebnisse ergab (s. Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Änderung der APP-mRNA-Expression in Abhängigkeit der ALRp-Konzentration. Nach 12 h Inkubation der HepG2-Zellen mit den angegebenen Substanzen wurden die Zellen geerntet und die Gene Fibrinogen  $\beta$  (A), Haptoglobin (B), SAA2 (C) und AT III (D) mittels RT-PCR analysiert. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (vs. Kontrolle); #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  (vs. IL-6 alleine);  $n = 3$ .

### 3.3.3 Einfluss von intrazellulärem ALRp auf die APP-mRNA-Expression

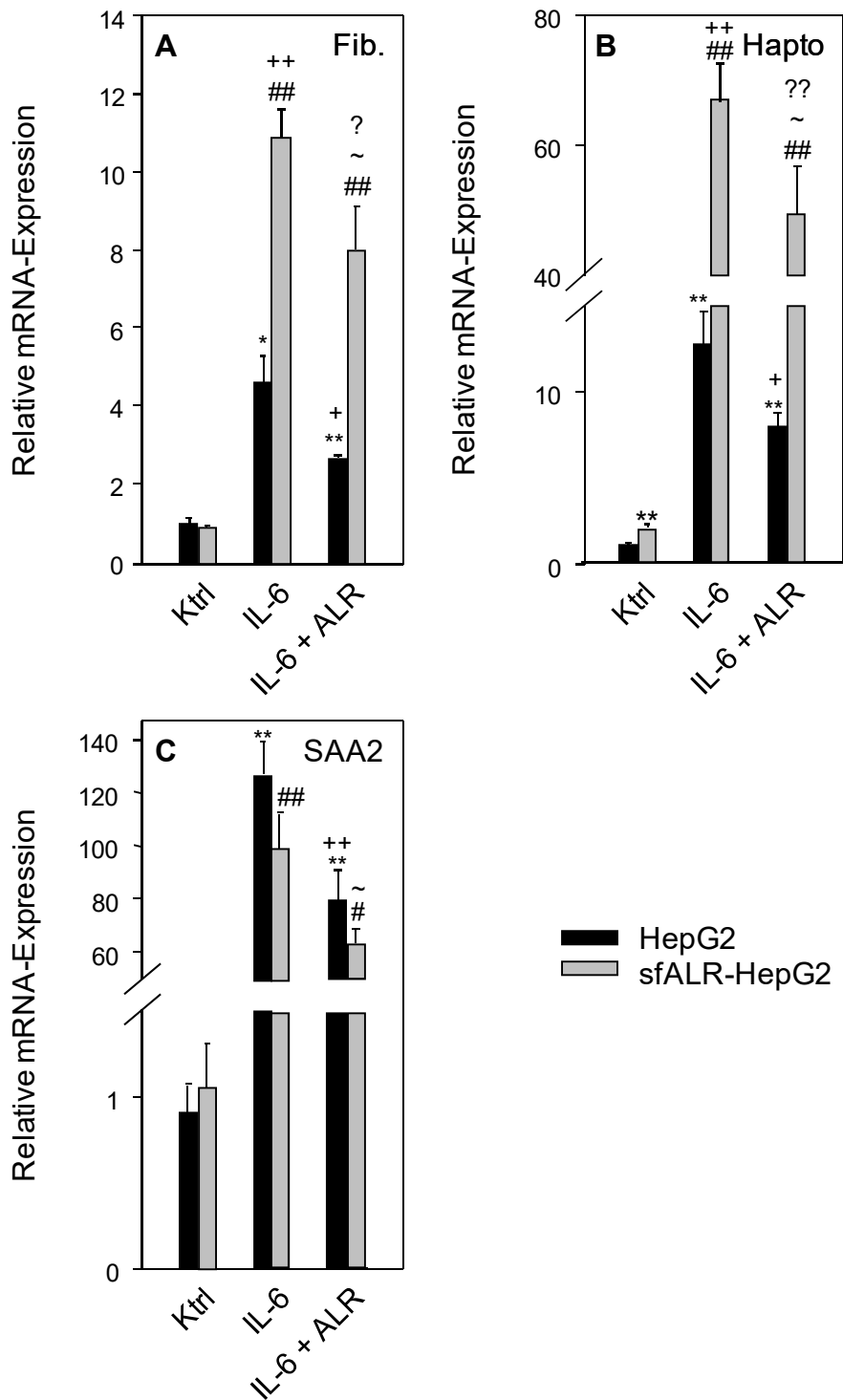
Um Erkenntnisse über den Einfluss des intrazellulären ALRp auf die Expression der APP-Gene zu erhalten, kamen HepG2-Zellen zur Anwendung, welche mit einem Expressionsplasmid für sfALR-pcDNA3 transfiziert wurden, welches sfALR stabil exprimiert. Zum Vergleich dienten Zellen, welche ein Plasmid ohne ALR-Gensequenz enthielten. In sfALR-HepG2-Zellen kommt es zu einer verstärkten Expression von sfALRp, in den Kontroll-Zellen hingegen nicht (Dayoub 2011).

Im Folgenden wurden HepG2- und sfALR-HepG2-Zellen für 24 h mit 25 ng/ml IL-6 oder der Kombination aus 25 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml ALRp behandelt. Eine unbehandelte Kontrolle wurde von beiden Zelllinien mitgeführt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die mRNA mittels RT-PCR analysiert. Zusätzlich zu den Genen Fibrinogen  $\beta$ , Haptoglobin und SAA2 wurde auch  $\alpha$ 1Antitrypsin untersucht.  $\alpha$ 1Antitrypsin reagierte bei der Etablierung des Zellkulturmodelles (s. 3.1.1) nach IL-6-Zugabe innerhalb von 24 h nicht mit einer Änderung der mRNA-Expression. Dieses Gen wurde im Folgenden untersucht, um zu sehen, welchen Einfluss erhöhtes intrazelluläres ALRp auf Gene besitzt, die in HepG2-Zellen ohne ALR-Überexpression unter den gewählten Bedingungen nicht der Regulation von IL-6 unterlagen.

Es zeigte sich eine erhöhte mRNA-Expression der APPs Fibrinogen  $\beta$  und Haptoglobin in sfALR-HepG2-Zellen im Vergleich zu HepG2-Zellen sowohl nach IL-6-Stimulation als auch nach Zugabe von IL-6 und ALR. Fibrinogen zeigte eine etwa doppelt so hohe mRNA-Expression der Gene in den sfALR-HepG2-Zellen, Haptoglobin sogar eine ungefähr siebenfache Erhöhung (s. Abbildung 18).

Bei SAA2 zeigte sich kein Unterschied zwischen den HepG2- und sfALR-HepG2-Zellen (s. Abbildung 18).

Einen Einfluss von IL-6 unter den gewählten Bedingungen konnte auch in den sfALR-HepG2-Zellen bei  $\alpha$ 1Antitrypsin nicht festgestellt werden (Daten nicht dargestellt).



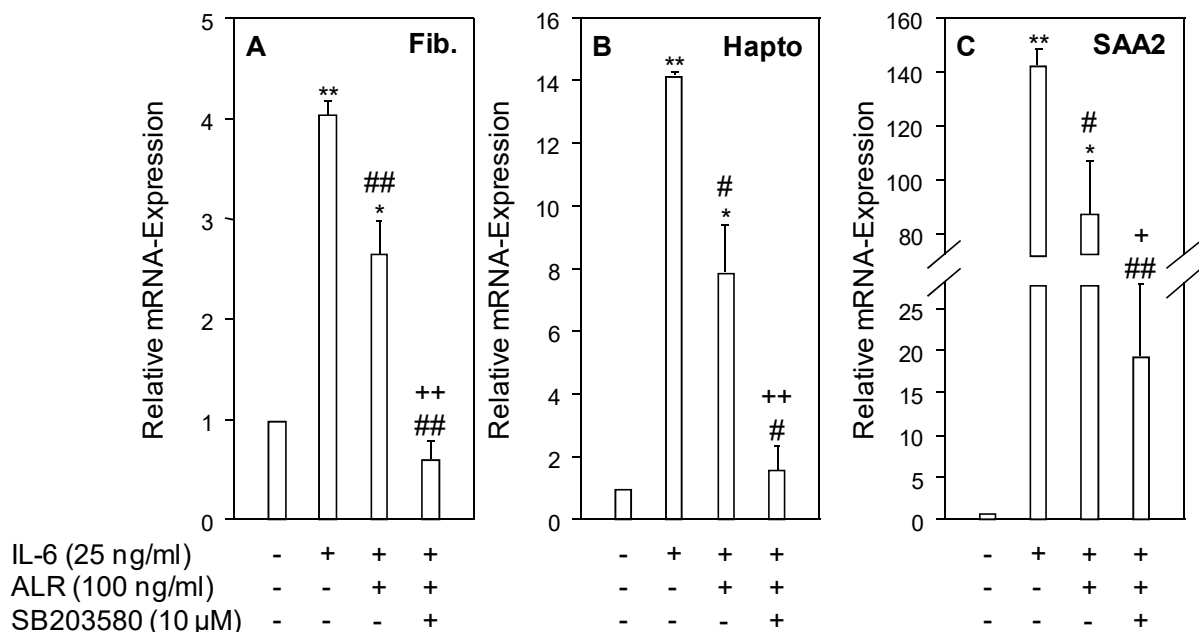
**Abbildung 18:** Vergleich der mRNA-Expression von APPs zwischen HepG2- und sfALR-HepG2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit 25 ng/ml IL-6 oder der Kombination aus 25 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml ALR inkubiert und daraufhin wurde die mRNA-Expression von Fibrinogen  $\beta$  (A), Haptoglobin (B) und SAA2 (C) mittels RT-PCR analysiert. Ausgenommen SAA2 zeigte sich bei allen anderen Genen eine signifikant höhere Expression der APPs in sfALR-HepG2. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (vs. HepG2-Kontrolle); #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  (vs. sfALR-HepG2-Kontrolle); +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$  (vs. IL-6 in HepG2-Zellen); ~  $p < 0,05$  (vs. IL-6 in sfALR-HepG2); ?  $p < 0,05$  (vs. IL-6 + ALR in HepG2), ??  $p < 0,01$  (vs. IL-6 + ALR in HepG2);  $n = 3$ .

### 3.3.4 Auswirkungen der Inhibition einzelner Signalkaskaden auf die APP-Expressions-Reduktion von ALRp

#### 3.3.4.1 Einsatz verschiedener Inhibitoren

Zur Identifikation einzelner potentieller Signalkaskaden, welche die Wirkung von extrazellulärem ALRp vermitteln, wurden Inhibitoren verschiedener Transkriptionsfaktoren oder Rezeptoren eingesetzt (s. 2.2.1.4).

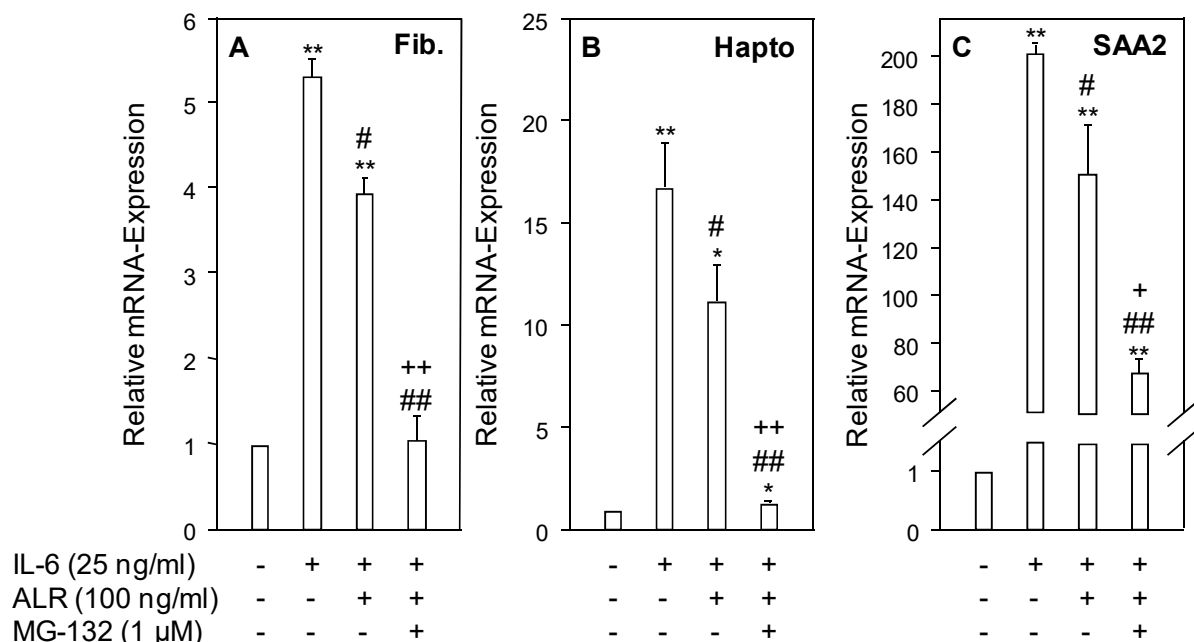
In einem ersten Versuch sollte gezeigt werden, ob die Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase sowie anderer Signalwege einen Effekt auf die Wirkung von ALR besitzen. Die Zellen wurden über 24 h mit den Inhibitoren inkubiert. Jedoch zeigte sich, dass die HepG2-Zellen vor allem unter dem NFκB-Inhibitor MG-132 stark zur Nekrose/Apoptose neigten. Der p38-MAPK-Inhibitor SB203580 führte in diesem Versuch zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression aller drei untersuchten APP-Gene im Vergleich zur Bedingung mit IL-6 plus ALRp. Unter Zugabe eines Inhibitors der ALR-Signalkaskade wäre aber eine Erhöhung der mRNA-Expression auf ein Niveau von IL-6 alleine zu erwarten. In diesem Fall konnte jedoch eine zusätzliche Reduktion - also Gegenteiliges - beobachtet werden. Daraus ist zu schließen, dass dieser Inhibitor die Signaltransduktion von IL-6 mitbeeinflusst, IL-6 also seinen Effekt wesentlich über die p38-MAPK vermittelt. Somit ist der Inhibitor für weitere Untersuchungen in diesem Versuchsmodell nicht geeignet, da er keine alleinige Beurteilung der durch ALRp vermittelten Effekte zulässt (s. Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Inhibition des p38-MAPK-Weges in ALR und IL-6 stimulierten HepG2-Zellen. Die Zellen wurden über 24 h mit den Inhibitoren plus IL-6 plus ALRp inkubiert. Der Inhibitor des p38-MAPK-Weges, SB203580, zeigte bei allen untersuchten Genen - Fibrinogen β (A),

Haptoglobin (B) und SAA2 (C) - eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression im Vergleich zur Bedingung mit IL-6 plus ALRp. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 (vs. Kontrolle); # p < 0,05, ## p < 0,01 (vs. IL-6); + p < 0,05, ++ p < 0,01 (vs. IL-6 + ALR); n = 3.

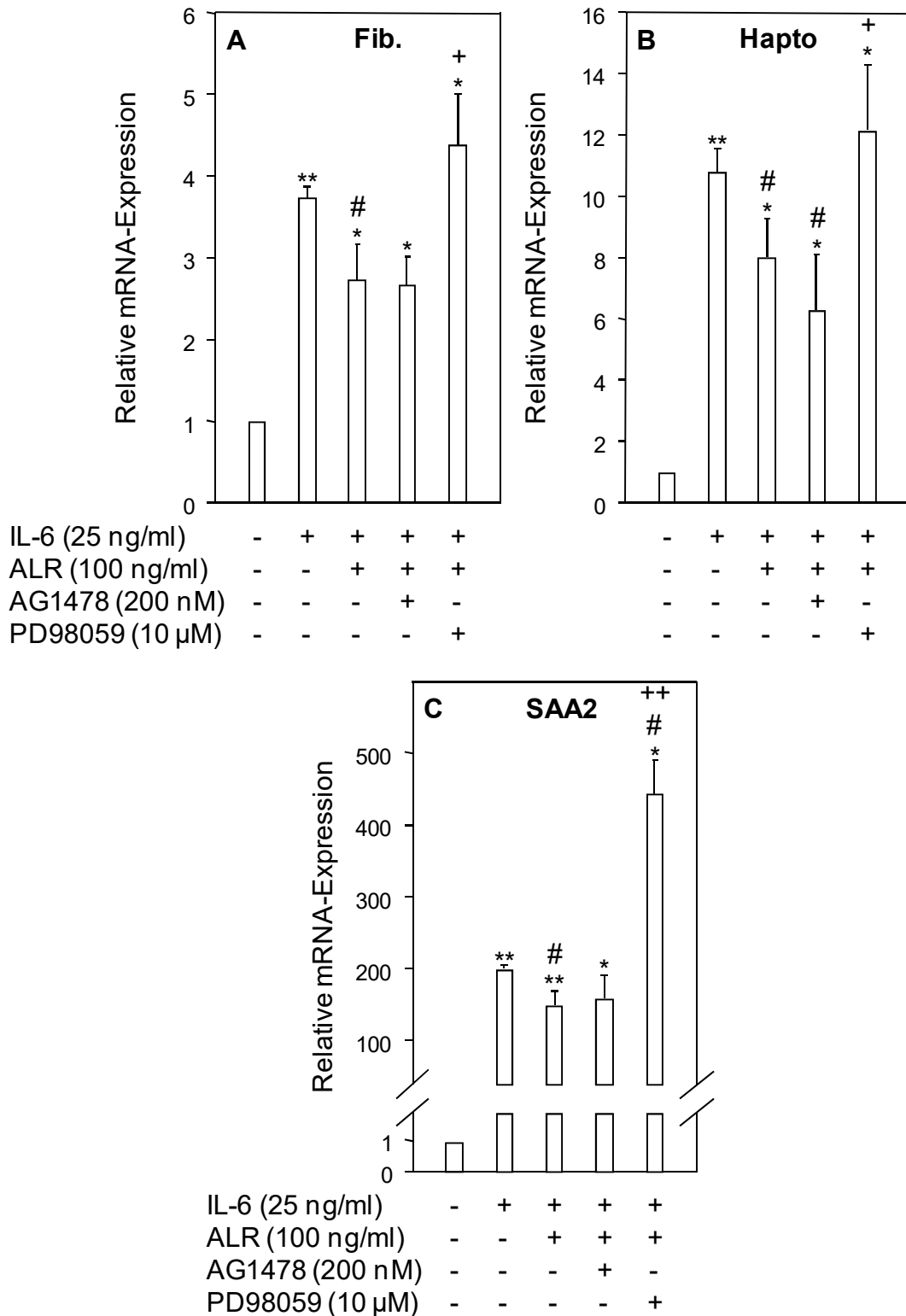
Die restlichen Inhibitoren wurden, um den zellschädigenden Effekt von MG-132 zu reduzieren, im weiteren Verlauf bei 12 h eingesetzt. Auch hier zeigten 10 µM MG-132 wieder deutliche Auswirkungen auf die Viabilität der Zellen, weshalb die Konzentration auf 1 µM MG-132 reduziert wurde. Bei dieser Konzentration blieben die Zellen unter dem Gesichtspunkt des Zelluntergangs optisch unbeeinträchtigt. Jedoch zeigte sich auch bei der Inhibition des NFκB-Weges durch MG-132 ein analoger Sachverhalt zu dem Inhibitor SB203580 (s.oben) - also eine zusätzlichen Reduktion der mRNA-Expression im Vergleich zur Bedingung IL-6 plus ALRp -, weshalb von einem weiteren Einsatz des Inhibitors MG-132 abgesehen wurde (s. Abbildung 20).



**Abbildung 20:** NFκB-Inhibition in ALR und IL-6 stimulierten HepG2-Zellen. Da eine 24 h - Inkubation zur Nekrose der HepG2-Zellen führte, wurden die Zellen für 12 h behandelt und die mRNA-Expression von Fibrinogen β (A), Haptoglobin (B) und SAA2 (C) mittels RT-PCR analysiert. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 (vs. Kontrolle); # p < 0,05, ## p < 0,01 (vs. IL-6); + p < 0,05, ++ p < 0,01 (vs. IL-6 + ALR); n = 3.

Die Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase wurde erst bei 200nM vorgenommen (AG1478) - entsprechend den Herstellerangaben. Hier zeigte sich kein Unterschied im Vergleich zur Stimulation mit IL-6 plus ALRp (s. Abbildung 21). Um auszuschließen, ob dies durch eine zu geringe Konzentration des Inhibitors verursacht wurde, wurde die Substanz in einem weiteren Versuch in höherer Konzentration eingesetzt, 1 µM. Es konnte hier kein Unterschied zum Einsatz von 200 nM festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Hingegen zeigte die Inhibition des ERK 1/2-Weges bei 10  $\mu$ M eine Aufhebung des durch ALRp vermittelten Effektes, die Werte aus der Kombination von IL-6, ALR und Inhibitor erreichten bei Fibrinogen und Haptoglobin ähnliche Werte als mit IL-6 alleine. In Bezug auf die SAA2-mRNA-Expression zeigte sich eine Steigerung bei PD98059-Behandlung (ERK1/2-Inhibitor) gegenüber allen anderen Bedingungen (s. Abbildung 21).



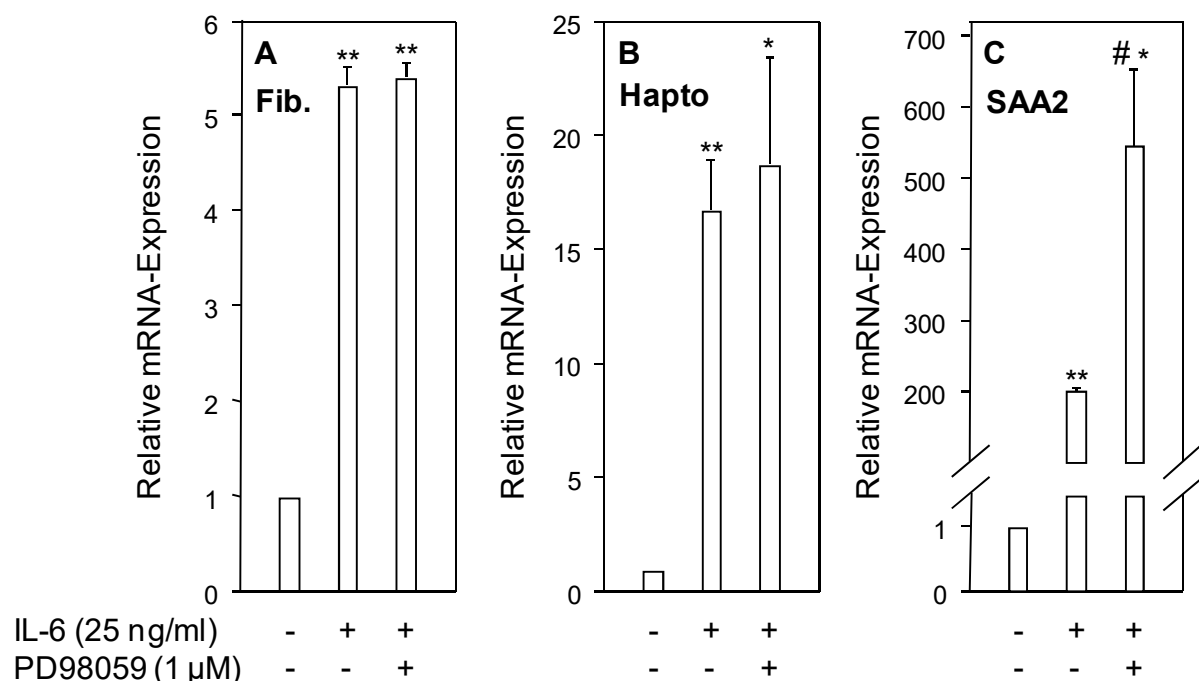
**Abbildung 21:** Inhibition von ERK 1/2 und EGFR unter ALRp- und IL-6-Stimulation in HepG2. Die Zellernte und Analyse der mRNA-Expression mittels RT-PCR der Gene Fibrinogen  $\beta$  (A), Haptoglobin (B) und SAA2 (C) erfolgte nach 12 h Inkubation mit den eingesetzten Substanzen.

Die Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase zeigte jedoch keine eindeutige Beeinflussung des ALR-Effektes, im Gegensatz zu der ERK 1/2-Inhibition. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (vs. Kontrolle); #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  (vs. IL-6); +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$  (vs. IL-6 + ALR);  $n = 3$ .

### 3.3.4.2 Überprüfung der Wirkung von PD98059 auf die IL-6- bzw. ALR- Signalkaskade

Da bei SAA2 der Inhibitor PD98059 zu einer weiteren Erhöhung der mRNA-Expression im Vergleich zu IL-6 alleine führte, ist von Interesse, ob die Behandlung mit dem Inhibitor per se Einfluss auf die Signaltransduktion von IL-6 besitzt.

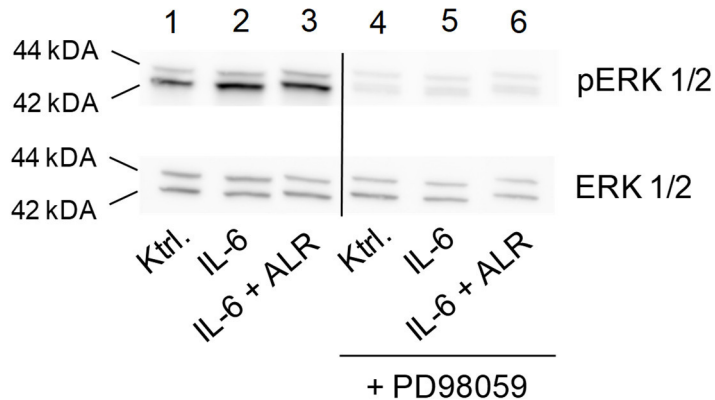
Hierzu wurden HepG2-Zellen für 12 h mit 25 ng/ml IL-6 oder 25 ng/ml IL-6 plus 10  $\mu$ M PD98059 behandelt. Die mRNA wurde mittels RT-PCR analysiert. Man konnte hierbei beobachten, dass der Zusatz von PD98059 zu IL-6 zu keiner signifikanten mRNA-Expressionsänderung von Haptoglobin und Fibrinogen  $\beta$  im Vergleich zu IL-6 alleine führt. Bei SAA2 hingegen konnte eine signifikant erhöhte mRNA-Expression bei der Kombination aus Inhibitor plus IL-6 im Vergleich zu IL-6 alleine beobachtet werden (s. Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Der Einfluss von PD98059 auf die mRNA-Expression von APPs bei IL-6-Stimulation in HepG2. Nach 12 h Inkubation mit IL-6 oder der Kombination aus PD98059 und IL-6 wurde die mRNA mittels RT-PCR analysiert. Bei den Genen Fibrinogen  $\beta$  (A) und Haptoglobin (B) zeigten sich keine Expressionsunterschiede zwischen den Bedingungen. Bei SAA2 (C) stellt man eine höhere mRNA-Expression nach Zugabe des Inhibitors zu IL-6 fest. \*  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  (vs. Kontrolle); #  $p < 0,05$  (vs. IL-6);  $n = 3$ .

Um zu überprüfen, ob die Zugabe des Inhibitors PD98059 zu einer verminderten Phosphorylierung von ERK1/2 führt, wurde die ERK 1/2-Phosphorylierung mittels Western Blot analysiert. Dazu wurden Zellen entweder mit oder ohne Inhibitor behandelt. Untersucht wurden die Bedingungen 25 ng/ml IL-6 und 25 ng/ml IL-6 plus

100 ng/ml ALRp. Eine unbehandelte Probe wurde als Kontrolle mitgeführt. Eine Vorstimulation mit ALR wurde bei diesem Versuch nicht vorgenommen. Die Zellen wurden nach 30 min geerntet, um die rasch ablaufenden Phosphorylierungsvorgänge erfassen zu können. Hierbei bestätigte sich die Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 unter allen drei Bedingungen (s. Abbildung 23).



**Abbildung 23:** ERK 1/2 - pERK 1/2 - Western Blot. Die HepG2-Zellen wurden für 30 min mit 25 ng/ml IL-6 und/oder 100 ng/ml ALR behandelt, eine Vorstimulation mit ALR wurde in diesem Versuch nicht vorgenommen.

Die Spuren mit den Nummern 1 bis 3 zeigen die Stimulationen ohne, die mit den Nummern 4 bis 6 mit Zugabe des Inhibitors PD98059 (eingesetzt in der Konzentration von 10  $\mu$ M). PD98059 reduziert die Phosphorylierung von ERK 1/2.

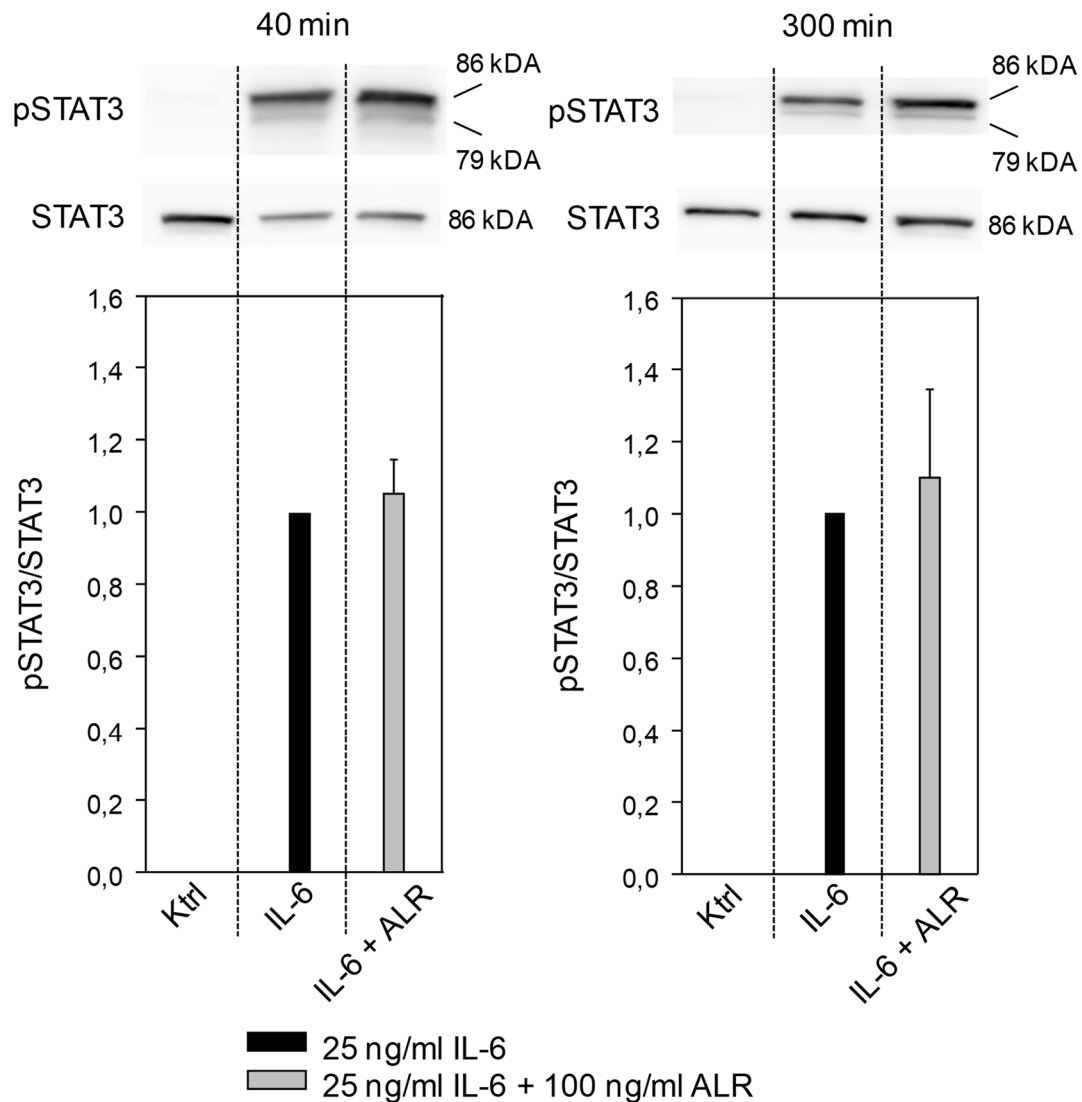
### 3.3.5 Untersuchung des Einflusses auf die STAT3-Phosphorylierung durch ALR

Der Einfluss von ALRp auf die IL-6-Wirkung kann auf verschiedenen Ebenen der Signalkaskaden von IL-6 stattfinden. Einer der ersten Schritte ist hierbei die Phosphorylierung des STAT3-Proteins. Es gibt mehrere regulatorische Mechanismen, welche die Phosphorylierung des STAT3-Proteins beeinflussen können, wie zum Beispiel die SOCS-Proteine.

Zur Untersuchung des Phosphorylierungsgrades des STAT3-Proteins wurden zwei Zeitpunkte gewählt, welche für die frühe (40 min) und die späte (5 h) STAT3-Aktivierung repräsentativ sind (Albrecht 2007). In einem speziellen Ansatz wurden HepG2-Zellen für 2 h mit 100 ng/ml ALR stimuliert. Dann wurden die Zellen entweder mit 25 ng/ml IL-6 allein oder in Kombination mit 100 ng/ml ALR für die gegebenen Zeitpunkte inkubiert. Anschließend wurden die Proteinhomogenate mittels Western Blot analysiert. Betrachtet wurde sowohl die Tyrosin(705)- als auch die Serin(727)-Phosphorylierungsstelle von STAT3.

Die Serin-Phosphorylierung war nur zum Zeitpunkt von 40 min, nicht mehr nach 300

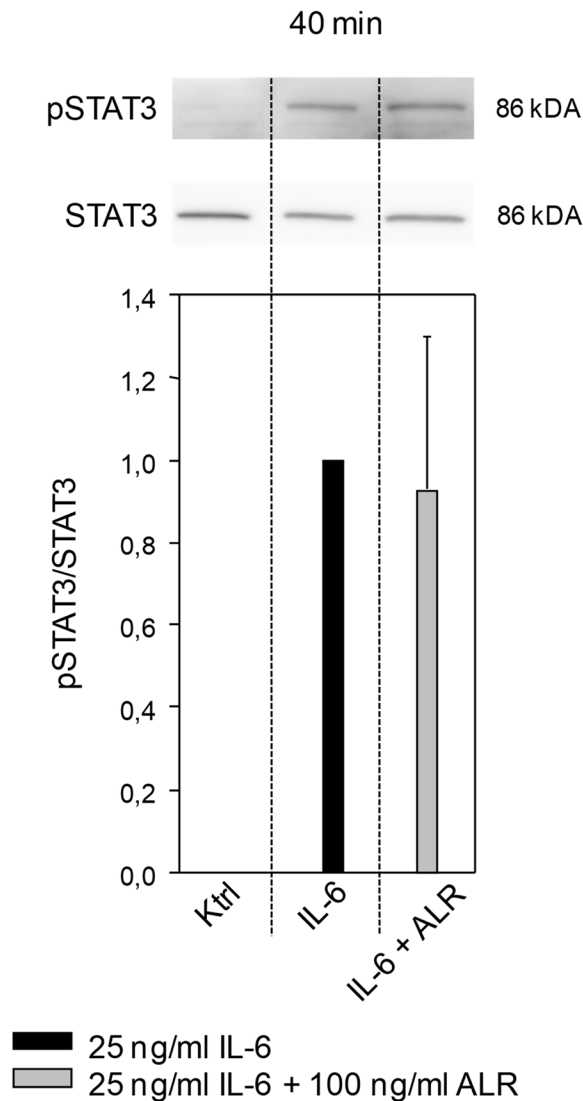
min detektierbar. Beide Phosphorylierungsstellen zeigten aber keine Unterschiede (s. Abbildungen 24 und 25).



**Abbildung 24:** TYR-STAT3-Phosphorylierung in IL-6/ALR behandelten Zellen. Nachdem die HepG2-Zellen für 40 bzw. 300 min mit 25 ng/ml IL-6 und/oder 100 ng/ml ALR inkubiert wurden, wurde die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht.

Als Kontrolle wurden nicht stimulierte Zellen verwendet.

Darunter sind die densitometrisch ausgewerteten Daten abgebildet, welche aus 3 unabhängigen Versuchen gewonnen wurden (ein Blot aus einem Versuch dargestellt). Als Referenzwert diente das pSTAT3/STAT3-Verhältnis in IL-6-stimulierten Zellen.



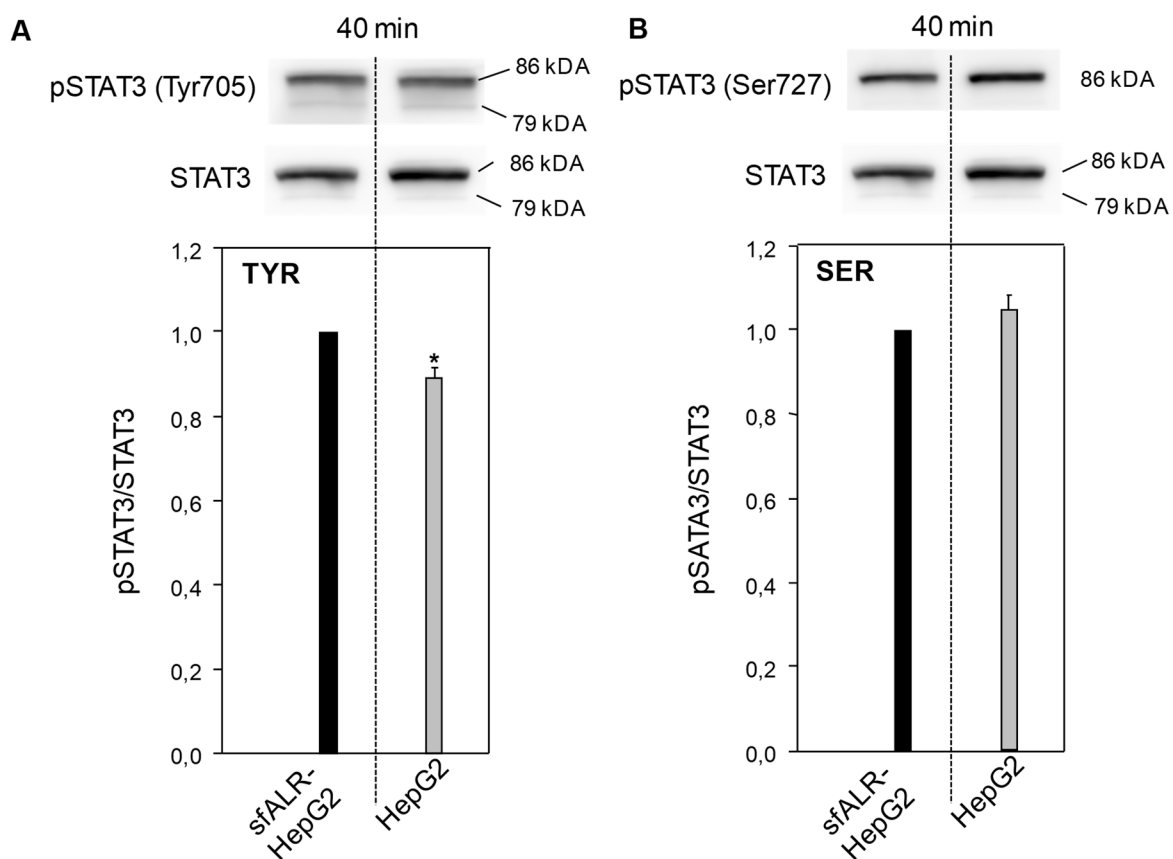
**Abbildung 25:** SER-STAT3-Phosphorylierungsgrad in IL-6/ALR behandelten Zellen. Wie in Abbildung 24 zeigt das obige Bild den Western Blot, das unten angeführte Diagramm die densitometrische Auswertung (von 3 Versuchen) der mit IL-6 und ALR stimulierten Zellen. Bei der Serin-Phosphorylierung war nach 40 min ein, nach 300 min jedoch kein Signal mehr zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Auch hier zeigte sich aber kein Unterschied im pSTAT3/STAT3-Verhältnis nach ALR-Zugabe.

### 3.3.6 Die Bedeutung des intrazellulären ALR für die STAT3-Phosphorylierung und -Dimerisierung

Da im Kapitel 3.3.3 beschrieben wurde, dass sfALR-HepG2-Zellen mit verstärkter, intrazellulärer ALRp-Expression mit einer größeren mRNA-Expressionsänderung der APPs Fibrinogen  $\beta$  und Haptoglobin auf die Stimulation mit IL-6 reagierten (im Vergleich zu HepG2-Zellen), wurde in einem weiteren Experiment die Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT3 betrachtet. Hierzu wurden sfALR-HepG2- und HepG2-Zellen je mit 25 ng/ml IL-6 stimuliert. Die Zellen wurden über 40 min mit IL-6 behand-

let und es wurden Western Blots der Proteinhomogenate durchgeführt. Im ersten Schritt sollte die Phosphorylierung der STAT3-Proteine untersucht werden. Deshalb wurden die Probenhomogenate mit DTT reduziert und auf Tyrosin- und Serin-Phosphorylierung untersucht. Es zeigte sich bei der Serin-Phosphorylierung kein Unterschied. Bei der Tyrosin-Phosphorylierung konnte bei der densitometrischen Auswertung ein minimales, aber signifikant geringeres Verhältnis von pSTAT3/STAT3 in HepG2-Zellen gezeigt werden (s. Abbildung 26).

In einem weiteren Schritt wurde die STAT3-Dimerisierung untersucht. Dieses Mal wurden die Proben nicht reduziert mit SDS-PAGE analysiert (s. dazu Abbildung 27). Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den sfALR-HepG2-Zellen und den HepG2-Mock-Zellen.



**Abbildung 26:** pSTAT3/STAT3-Vergleich zwischen HepG2- und sfALR-HepG2-Zellen. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung dreier unabhängiger Versuche (n = 3), von denen wieder einer als Blot gezeigt wird. (A) zeigt die Tyrosin-Phosphorylierung, (B) die Serin-Phosphorylierung von STAT3 von für 40 min mit 25 ng/ml IL-6 stimulierten sfALR-HepG2- und HepG2-Zellen im Vergleich. Bei der Phosphorylierung am Tyrosin zeigte sich in den durchgeführten Versuchen eine minimal geringeres Verhältnis von pSTAT3/STAT3 in HepG2-Zellen \* p < 0,05 (vs. Klon).

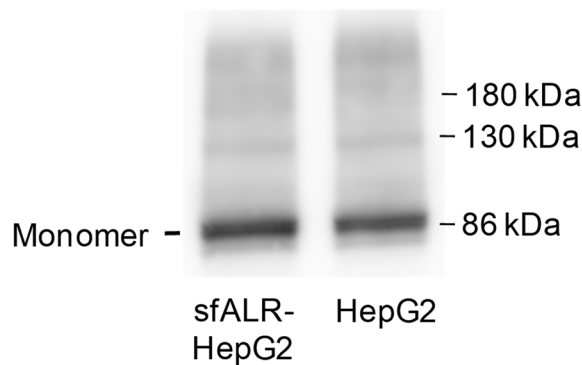


Abbildung 27: STAT3-Dimerisierung im Vergleich zwischen HepG2- und sfALR-HepG2-Zellen. Untersucht wurden nicht reduzierte Proteinproben. Die Zellen wurden für 40 min mit 25 ng/ml IL-6 stimuliert.

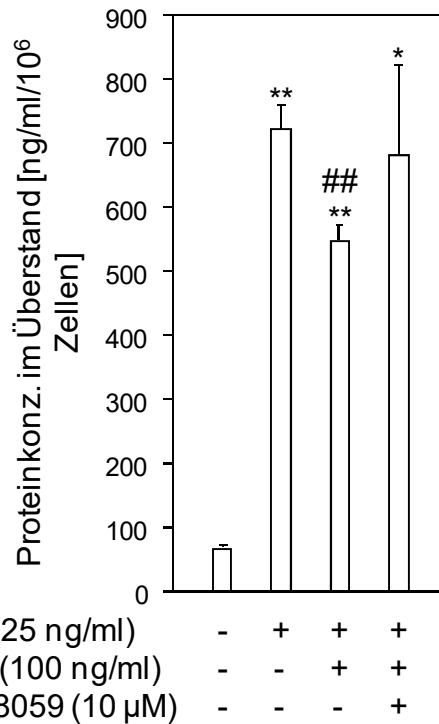
### 3.3.7 Der Einfluss von ALR auf die APP-Freisetzung - Proteinbestimmung im Zellkulturüberstand

#### 3.3.7.1 Die Wirkung von ALRp auf die APP-Produktion in HepG2-Zellen

Die auf mRNA-Ebene gewonnenen Ergebnisse bezüglich des Einflusses von ALRp auf die Expression von APPs wurden im Folgenden auf Proteinebene untersucht. Dazu wurde die Sekretion der APPs Haptoglobin und Fibrinogen unter den gewählten Bedingungen im Zellkultur-Überstand analysiert.

Untersucht wurden die Bedingungen 25 ng/ml IL-6, 25 ng/ml IL-6 + 100 ng/ml ALR und 25 ng/ml IL-6 + 100 ng/ml ALR + 10  $\mu$ M PD98059. Die Zellen wurden entsprechend den unter 2.2.1.4 gemachten Angaben mit ALR und Inhibitor vorstimuliert. Nach 24 h wurde der Überstand abgenommen und zur Messung aufbereitet. Die unten angegebenen Konzentrationen wurden auf  $10^6$  ausgesäete Zellen bezogen. Haptoglobin wurde in den Verdünnungen 1:10 und 1:50 gemessen. Es zeigte sich durchwegs eine Bestätigung der Ergebnisse, welche auch auf mRNA-Ebene gewonnen wurden. So erniedrigt ALRp die Protein-Sekretion von Haptoglobin signifikant um etwa 25 %. Durch Zugabe des ERK1/2-Inhibitors wird diese Wirkung aufgehoben (s. Abbildung 28).

Bei Fibrinogen stellt sich der Sachverhalt anders dar. Hier wiesen die einzelnen Versuche eine starke Streuung auf. Trotz allem ist aber erkennbar, dass ALR in allen drei Versuchen zu einer Reduktion der Protein-Sekretion bei gleichzeitiger Stimulation mit IL-6 führt. PD98059 zeigte hier eine weitere Reduktion des Proteins auf Werte von 10% des Wertes bei Stimulation mit IL-6 plus ALRp - nicht in der Tabelle gezeigt (s. Tabelle 6).



**Abbildung 28:** Bestimmung von Haptoglobin aus dem HepG2-Zellkultur-Überstand mittels ELISA. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf 10<sup>6</sup> ausgesäte Zellen. Nach 24 h Stimualtion der Zellen mit den jeweiligen Substanzen wurde der Überstand der Zellkultur entnommen und mittels ELISA für das Protein Haptoglobin gemessen. Hier zeigte sich ebenfalls eine deutliche Reduktion des IL-6-Signals durch ALR, die Inhibition des ERK 1/2-Weges durch PD98059 konnte diesen Effekt wiederum aufheben. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 (vs. Kontrolle); # p < 0,05, ## p < 0,01 (vs. IL-6); n = 3.

**Tabelle 6:** Bestimmung von Fibrinogen aus dem HepG2-Zellkultur-Überstand mittels ELISA. In allen drei Versuchen ist eine Reduktion erkennbar, jedoch streuen die Werte der einzelnen Versuche, sodass ein Vergleich der Mittelwerite untereinander nicht möglich ist. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf 10<sup>6</sup> ausgesäte Zellen.

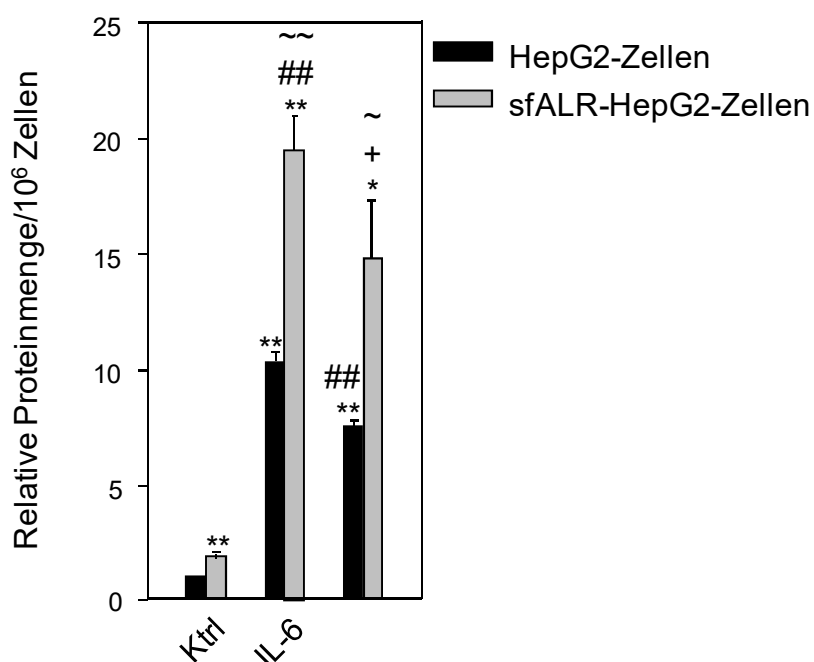
Bedingung	Fibrinogen β - Konzentration [ng/ml/10 <sup>6</sup> Zellen]		
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Kontrolle	1037	335	909
IL-6	6258	4911	6783
IL-6 + ALR	3744	3970	5915
<u>Reduktion</u>	40%	19%	13%

### 3.3.7.2 Vergleich zwischen sfALR-HepG2- und HepG2-Zellen

Auch die unterschiedliche Reaktion von sfALR-HepG2-Zellen auf IL-6 im Vergleich zu HepG2-Zellen wurde mittels ELISA untersucht. Das Vorgehen und die Verdünnungen entsprechen denen von 3.3.7.1.

Bei dem APP Haptoglobin konnte bei sfALR-HepG2-Zellen eine höhere Sekretion in der unbehandelten Kontrolle gemessen werden. Nach IL-6-Stimulation zeigten die sfALR-HepG2-Zellen eine signifikant höhere Sekretion in den Zellkulturüberstand im Vergleich zu HepG2-Zellen (s. Abbildung 29).

Bei Fibrinogen wurden im Zellkulturüberstand der sfALR-HepG2-Zellen Konzentrationen von über 8000 ng/ml nach IL-6-Stimulation detektiert. Somit ist davon auszugehen, dass auch Fibrinogen in sfALR-HepG2-Zellen verstärkt produziert und in den Zellkultur-Überstand sezerniert wird, auch wenn die konkreten Zahlenwerte, aufgrund Überschreitung des Messbereiches des Kits bei den Proben der sfALR-HepG2-Zellen, nicht angegeben werden können (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 29:** Vergleich der Haptoglobin-Sekretion von sfALR-HepG2- und HepG2-Zellen. Es erfolgte die Entnahme des Zellkulturüberstandes nach 24 h Inkubation mit 25 ng/ml IL-6 und/oder 100 ng/ml ALR. Die erhaltenen Konzentrationen wurden zur Kontrolle der HepG2-Zellen in Relation gesetzt und beziehen sich auf 10<sup>6</sup> Zellen. Man erkennt, dass die sfALR-HepG2-Zellen im gleichen Zeitraum deutlich mehr Haptoglobin sezernierten als die HepG2-Zellen. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 (vs. Kontrolle in HepG2); ## p < 0,01 (vs. IL-6 in HepG2); + p < 0,05 (vs. IL-6 + ALR in HepG2); ~ p < 0,05, ~ p < 0,01 (vs. IL-6 in sfALR-HepG2); n = 3.

## 4. Diskussion

### 4.1 Einfluss von ALRp auf die Zelllinie RAW

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres ALRp zu einer Erhöhung der IL-6-, TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression in der Makrophagen-Zelllinie RAW führt. Nach 6 h Inkubation mit 100 ng/ml ALRp zeigte sich im zeitlichen Verlauf die stärkste Erhöhung dieser Expressionsänderung. Ein Einfluss einer potentiellen LPS-Verunreinigung des in Bakterienkultur rekombinant hergestellten ALRp konnte durch den Einsatz von PmB ausgeschlossen werden. Eine Inhibition der Signalewege der p38-MAPK, von NF $\kappa$ B und der EGFR-Tyrosinkinase hatte bei den durch ALRp erhöhten IL-6- und TNF- $\alpha$ -mRNA-Expressionen keinen Einfluss. Bei IL-1 $\beta$  führte hingegen die Inhibition der p38-MAPK und EGFR-Tyrosinkinase zu einer signifikanten Reduktion der durch ALRp induzierten mRNA-Expression (Daten s. Kapitel 3.2).

Bisher wurde gezeigt, dass ALRp die Expression der Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  in Kupffer-Zellen erhöht (Gandhi 2010). Es konnte ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor identifiziert werden, welcher in diesen Zellen die Wirkung von ALRp vermittelt. Desweiteren wurden p38-MAPK und NF $\kappa$ B als Signaltransduktionswege von ALRp in Kupffer-Zellen identifiziert (Gandhi 2010). Durch Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit konnte ein Einfluss von ALRp auf die mRNA-Expression von Zytokinen auch auf die nicht-gewebsständige Makrophagen-Zelllinie RAW festgestellt werden. ALRp wirkt somit nicht nur lokal in der Leber, sondern könnte auch auf im systemischen Kreislauf zirkulierende Makrophagen bezüglich einer vermehrten Zytokin-mRNA-Expression einen Einfluss haben.

Diese potentielle systemische Wirkung könnte bedeuten, dass erhöhte Serumkonzentrationen von ALRp ein sogenanntes "*systemic inflammatory response syndrome*", kurz SIRS, auslösen könnten. Dem gegenüber steht jedoch, dass trotz regelmäßiger Applikation dieses Proteins in höheren Konzentrationen in unterschiedlichen Organismen Berichte über die Entwicklung eines solchen Syndroms vollständig fehlen. Hieraus lässt sich schließen, dass die verstärkte Produktion von Zytokinen durch ALRp alleine nicht essenziell für den Ablauf einer systemischen (patho-) physiologischen APR ist. Vielmehr dürfte die Bedeutung dieser Wirkung von ALRp in der Förderung der Leberregeneration und Vermittlung anderer gewebsspezifischer Reaktionen liegen. Die Unterschiede der in-vitro-Ergebnisse dieser Arbeit zu der tatsächli-

chen Situation in-vivo können auch durch unterschiedliche Eigenschaften der maus-ähnlichen Makrophagen-Zelllinie RAW und den tatsächlich im Organismus vorhandenen Makrophagen zustande kommen.

Bekannt ist, dass es nach Leberzellschädigung, zum Beispiel im Rahmen einer partiellen Hepatektomie, zu einer verstärkten Expression von IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in nichtparenchymalen Zellen der Leber kommt (Higashitsuji 1995). Die vermehrte Expression von Zytokinen ist ein wesentlicher Bestandteil der Modulierung der Leberregeneration, so konnte zum Beispiel bei Applikation von Anti-TNF- $\alpha$ -Antikörpern eine geringeres Ausmaß an DNA-Synthese nach partieller Hepatektomie beobachtet werden (Akerman 1992). Diese Zytokine sind also für den Schritt des sogenannten "*Priming*" notwendig, dem Überführen der in der G<sub>0</sub>-Phase ruhenden Hepatozyten in die aktive G<sub>1</sub>-Phase (Fausto 1995). ALRp könnte durch die vermehrte Zytokinproduktion in Makrophagen diesen Vorgang und hierdurch die Regeneration der Leber unterstützen. In dieser Arbeit konnten erste Ergebnisse gezeigt werden, dass ALRp dazu auch nicht-gewebsständige Makrophagen zur Produktion von Zytokinen anregen kann. Dies könnte zum Beispiel bei einem übermäßigen Verlust von Lebergewebe von Bedeutung sein, indem ALR nicht-gewebsständige Makrophagen zur Expression dieser Zytokine induziert.

Durch die hier gewonnene Erkenntnis einer potentiell systemische Bedeutung von ALRp für die Makrophagen-Aktivierung kann die Induktion von Zytokinen auch in anderen Organen, in welchen das Protein nachgewiesen werden konnte, einen möglichen Wirkmechanismus darstellen. Die Rolle von ALRp scheint hier jedoch weniger eindeutig als in der Leber und ist bisher unzureichend erforscht.

In der Niere wurde bisher die Auswirkung von ALRp auf Nierenzellen selbst untersucht. Hier gibt es Unterschiede bezüglich der Wirkung, abhängig davon ob intra- oder extrazelluläres ALRp betrachtet wird. So stellt Yan 2015 im renalen Gewebe bei Ischämie-Reperfusion eine verminderte Produktion von IL-1 $\beta$  und IL-6 bei Applikation von ALRp (extrazellulär) fest (Yan 2015a). Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte ebenfalls 2015, dass intrazelluläres ALRp aber für die Expression von Zytokinen in den Nierenzellen HK-2 notwendig zu sein scheint, denn in Zellen mit verminderter intrazellulärer ALRp-Expression konnte eine verminderte Zytokinproduktion nach Hypoxie beobachtet werden (Yan 2015b). ALR könnte aber auch durch Interaktion mit systemisch zirkulierenden Makrophagen in der Niere zur vermehrten Expression von Zytokinen führen. Der Effekt dieser Expressionserhöhung kann jedoch aus heutigem Erkennt-

nisstand nicht abschließend interpretiert werden, denn eine vermehrte Expression von Zytokinen, wie zum Beispiel IL-6, führte im Ischämie-Reperfusion-Modell der Niere zu einer Exazerbation des auf diese Situation folgenden Nierenversagens. Eine vermehrte Zytokinexpression stellte sich in diesem Fall als nicht nephroprotektiv heraus (Kielar 2005).

Im Hoden, welcher neben der Leber die höchste Expression von ALR aufweist (s. dazu Kapitel 1.2.2), könnte das Protein über die Beeinflussung von Zytokinen zum Beispiel regulierend in die Spermatogenese eingreifen, da Zytokine die Hormonproduktion im Hoden modulieren können (Hales 1999).

Die Freisetzung von ALR nach Gewebsschädigung kann, wie bereits Vodovotz 2012 postulierte, ein inflammatorisches Alarmsignal für den Organismus darstellen (Vodovotz 2012). Im Säugetier-Organismus wurden bereits eine Reihe von Proteinen und Molekülen identifiziert, welche eine ähnliche Wirkung wie ALR besitzen. Sie werden als DAMPs - "*damage-associated molecular pattern*" - zusammengefasst und werden, wie ALRp, bei Zellschädigung aus dem Zellinneren freigesetzt und vermitteln durch deren erhöhte Konzentration im Serum die inflammatorische Antwort auf schädigende Einflüsse (Kono 2008). Die Funktion von vermehrt freigesetztem ALRp nach Zellschädigung ist also der sogenannter DAMPs sehr ähnlich (Vodovotz 2012). Alleine ist ALR jedoch nicht in der Lage eine SIRS auszulösen, es bedarf offenbar dazu noch weitere Mediatoren (s. weiter oben im Kapitel 4.1).

Vergleicht man den Einfluss von ALR auf die Zytokinexpression mit der anderer Wachstumsfaktoren der Leber, so stellt man fest, dass dieser nicht ohne Weiteres auf andere Faktoren zu übertragen ist. Von HGF, ein weiterer potenter Wachstumsfaktor der Leber, wird Gegenteiliges berichtet. So senkt HGF die Zytokinexpression in Makrophagen und wirkt dadurch antiinflammatorisch (Kusunoki 2014). Dies unterstreicht, dass die unterschiedlichen Wachstumsfaktoren der Leber mit ihren Wirkmechanismen ganz bestimmte, nicht redundante Aufgaben im Rahmen der Regeneration vermitteln.

## **4.2 Einfluss von ALRp auf die APP-Expression in HepG2**

In HepG2-Zellen wurde in dieser Arbeit erstmalig der Einfluss von ALRp auf die Expression und Sekretion von APPs untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres ALRp zu einer Reduktion der IL-6 stimulierten mRNA-Expression der APPs Haptoglobin, Fibrinogen  $\beta$  und SAA2 um etwa 30% des Ausgangswertes führte. Bei

Haptoglobin und Fibrinogen  $\beta$  konnte auch eine geringere Proteinsekretion ins Zellkulturmedium beobachtet werden. Das maximale Ausmaß der Reduktion der mRNA-Expression zeigte sich hierbei nach einer Inkubation von 12 bis 24 h und einer Konzentration von 100 ng/ml. Ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen ALRp-Konzentration und Ausmaß der Reduktion konnte nicht beobachtet werden. Das Wirkmaximum lag hier bei 100 - 250 ng/ml ALRp. Höhere Konzentration führten zu keiner stärkeren, teilweise sogar geringeren Reduktion der mRNA-Expression von APPs. Als potentielle Signalkaskade der ALRp-Wirkung konnte der ERK1/2-Weg identifiziert werden. Ein Einfluss von ALRp auf die Phosphorylierung von STAT3 konnte unter den gewählten Bedingungen nicht gezeigt werden, auch führte die Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase zu keiner Aufhebung der von ALRp vermittelten Reduktion.

In Zellen mit einer verstärkten Expression an sfALR konnte eine höhere mRNA-Expression der untersuchten APPs Haptoglobin und Fibrinogen  $\beta$  nach IL-6-Zugabe gemessen werden. Es zeigte sich auch ein erhöhtes Maß an Sekretion dieser APPs. Bei SAA2 konnte jedoch keine erhöhte mRNA-Expression in den sfALR-HepG2-Zellen gezeigt werden.

#### **4.2.1 Wirkung und Signaltransduktion von extrazellulärem ALRp bzgl. seines Einflusses auf die Änderung der APP-Expression und Vergleich mit anderen Wachstumsfaktoren der Leber**

Vergleicht man die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bezüglich des Einflusses von ALRp auf die Expression von APPs mit anderen Wachstumsfaktoren der Leber, so stellt man fest, dass es sowohl Parallelen als auch Unterschiede gibt. Bei HGF zum Beispiel sieht man unterschiedliche Einflüsse auf unterschiedliche APPs. So führt HGF bei Zugabe zu humanen Hepatozyten zu einer vermehrten Synthese von Albumin, Transferrin, Fibronectin, Fibrinogen oder  $\alpha$ 2-Macroglobulin. Die Synthese von  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin und Haptoglobin wird hingegen durch HGF-Stimulation reduziert. Auf die CRP-Produktion konnte kein Einfluss von HGF gezeigt werden. HGF wirkte bei vielen APPs in dieser Untersuchung divergent im Vergleich zu IL-6 (Guillén 1996). Gemeinsam scheint HGF und ALR die Eigenschaft zu sein, den Einfluss von IL-6 auf die APPs zu modulieren beziehungsweise zu reduzieren. Ebenso gemeinsam haben die beiden Wachstumsfaktoren die Beeinflussung von SAA. In Huh7-Zellen konnte nämlich eine Reduktion der Expressionserhöhung durch IL-1 $\beta$  nach

Zugabe von HGF beobachtet werden (Raynes 1994). Hier lässt sich also ein Synergismus von ALR und HGF feststellen.

Auch vom Wachstumsfaktor "*Insulin liked growth factor*", kurz IGF, ist bekannt, dass er einen Einfluss auf die APP-Produktion besitzt (Spies 2002).

Mehr Gemeinsamkeiten hingegen gibt es bei dem Wachstumsfaktor EGF mit ALR. Denn auch EGF besitzt einen Einfluss auf die Expression von APPs. So reduziert die Zugabe von EGF zu mit IL-6 stimulierten HepG2-Zellen die Expression von Haptoglobin und Fibrinogen (Wang 1999b) - also analog zu ALR. Parallel zu diesen Erkenntnissen identifiziert Wang 1999 ebenfalls die ERK1/2-Phosphorylierung als ausschlaggebend für die Vermittlung des EGF-Effektes (Wang 1999b).

Die Wirkung von ALR ist also mit der von EGF vergleichbar. Einerseits reiht sich ALR durch seine Modulation der APPs zu Wachstumsfaktoren der Leber ein, über die wir bereits ähnliches wissen. Andererseits legen die Parallelen zu EGF nahe, dass ALR die selben Signalwege verwendet, um eine Reduktion der APP-Expression zu erreichen. Ob die Reduktion der mRNA-Expression der APPs nun über eine EGFR-Aktivierung durch den ALR-R geschieht oder durch Schnittpunkte beider Signalwege bei anderen Transkriptionsfaktoren ist noch nicht abschließend geklärt. In dieser Arbeit konnte jedoch trotz Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase ein Effekt von ALR beobachtet werden.

Betrachtet man nun die potentiellen Wege der Signaltransduktion von ALRp, so stellt man fest, dass bisher bereits ein potentieller Zusammenhang der antiinflammatorischen Wirkung von ALR durch Interaktion mit STAT3 und SOCS3 beschrieben wurde (Parvanov 2010). In der Arbeit von Parvanov wird eine Inhibition von STAT3 durch ALR beobachtet und der Signalweg von ERK1/2 als ursächlich dafür angegeben. Die Erkenntnisse in der vorliegenden Arbeit unterstreichen die Bedeutung des ERK1/2-Signalweges für die Vermittlung der Reduktion der mRNA-Expression von APPs unter IL-6-Stimulation bei Zugabe von ALRp. Eine Beeinflussung von STAT3 beziehungsweise dessen Phosphorylierung durch ALRp konnte unter den gewählten Bedingungen nicht beobachtet werden. Weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppe bei anders gewählten Zeitpunkten ergaben jedoch, dass nach Zugabe von extrazellulärem ALRp die IL-6-vermittelte STAT3-Phosphorylierung nach 5 und 15 min reduziert wird, bei späteren Zeitpunkten, wie unter anderem in dieser vorliegenden Arbeit gewählt, ist diese Wirkung nicht mehr zu beobachten (Dayoub 2017). Überraschen-

der Weise wurde jedoch beobachtet, dass extrazelluläres ALRp zu einer Reduktion der Phosphorylierung von SHP2, einem negativen Regulator der STAT3-Aktivierung (s. Abbildung 9), führt. Sowohl auf SOCS3 als auch auf PIAS scheint extrazelluläres ALRp keinen Einfluss zu besitzen (Dayoub 2017). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ALRp auf andere Weise in die Regulation der STAT3-Aktivität eingreift, als über SOCS, PIAS und SHP2. Möglich wäre zum Beispiel eine Beeinflussung der JAK-Aktivität oder der Dimerisierung von gp 130 (Dayoub 2017). Auch ERK1/2 wird als negativer Regulator des STAT3-Signals beschrieben (Jain 1998; Sengupta 1998). Die hier gewonnenen Ergebnisse, welche die ERK1/2-Aktivität als möglichen Transduktionsweg von extrazellulärem ALRp beschreiben, unterschreiben dies. Es gibt auch noch weitere mögliche Schnittpunkte in der Signalkaskade von ALR und der von IL-6, wie zum Beispiel der Transkriptionsfaktor NFκB. So ist bekannt, dass NFκB die STAT3-Aktivität negativ beeinflussen kann (Albrecht 2007). Über diesen Faktor könnte auch ALRp Einfluss auf die APP-Expression nehmen, wenn es auch in dieser Arbeit nicht gezeigt werden konnte, da eine Inhibition von NFκB die IL-6-vermittelte, verstärkte mRNA-Expression von APPs beeinflusst und somit keine gesonderte Untersuchung bezüglich des Einflusses von ALRp möglich ist. Um weitere Erkenntnisse über die Beeinflussung der IL-6-Signalkaskade durch ALRp zu gewinnen, bedarf es sicherlich noch weiterer Untersuchungen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bieten dazu zahlreiche Ansatzpunkte.

#### **4.2.2 Intrazelluläres ALRp und seine Wirkung auf die APP-Expression**

Betrachtet man die Erkenntnisse bezüglich des Vergleiches der APP-Expression in sfALR-HepG2-Zellen mit verstärkter intrazellulärer ALR-Expression mit HepG2-Zellen mit normaler Expression, so stellt man erstens fest, dass vermehrtes intrazelluläres sfALR zu einer erhöhten mRNA-Expression der APPs Haptoglobin und Fibrinogen führt und zweitens die Sekretion dieser APPs ins Zellkulturmedium ebenfalls steigert. Die mRNA-Expression von SAA2 beeinflusste intrazelluläres ALRp unter den gewählten Bedingungen nicht. Dies könnte unter anderem durch die abweichende Reaktion von SAA2 im zeitlichen Verlauf im Vergleich zu den anderen beiden Protein zustände kommen - SAA2 reagierte bereits nach 6 h maximal auf IL-6-Stimulation, wohingegen Fibrinogen und Haptoglobin dies erst nach 12 bzw. 24 h taten. Auf die Reduktion der APP-Produktion nach IL-6-Stimulation bei Zugabe von extrazellulärem ALRp scheint intrazelluläres ALRp keinen Einfluss zu besitzen, da das

Maß der Reduktion in sfALR-HepG2-Zellen und HepG2-Zellen in etwa gleich ist. Dadurch ist der Rückschluss möglich, dass intrazelluläres ALR bei der Vermittlung des Einflusses von extrazellulärem ALRp auf die APP-Expressionsänderung nicht beteiligt ist.

In weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass man in sfALR-HepG2-Zellen nach IL-6-Stimulation eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung von STAT3 vorfindet. Bezüglich der Serinphosphorylierung konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Desweiteren zeigte sich bei den sfALR-HepG2-Zellen eine verstärkte Aktivität von SHP2 nach IL-6-Stimulation. Auf SOCS3 und PIAS zeigte auch intrazellulär vermehrt vorhandenes ALRp keinen Einfluss. Diese Ergebnisse zeigen, dass intrazellulär vorkommendes ALRp andere Funktionen im Entzündungsgeschehen der Leber besitzt, als extrazelluläres. Intrazelluläres ALRp verstärkt somit die IL-6-Empfindlichkeit der HepG2-Zellen (Dayoub 2017).

Inwieweit die verstärkte Expression und Sekretion der APPs durch intrazelluläres ALRp eine physiologische Bedeutung besitzt oder nur Ausdruck einer allgemein erhöhten Reaktivität der HepG2-Zellen gegenüber IL-6 ist, ist noch nicht abschließend geklärt. Ebenso nicht, inwiefern intrazelluläres ALRp für die APR essentiell ist - sprich, ob es ohne Gegenwart von ALRp zu einer verringerten Produktion von APPs kommt.

### **4.3 Bedeutung der beobachteten Auswirkung von ALRp für die Leberregeneration**

Bereits in den vorausgegangenen Kapiteln der Diskussion (4.1 und 4.2) wurde mehrmals die Bedeutung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse von ALRp für die Leberregeneration erläutert. Im Folgenden soll der Zusammenhang der Ergebnisse im Makrophagen-Modell und der im epithelialen Zellkulturmodell erläutert werden und die Auswirkungen dieses Proteins auf die Leberregeneration genauer betrachtet werden.

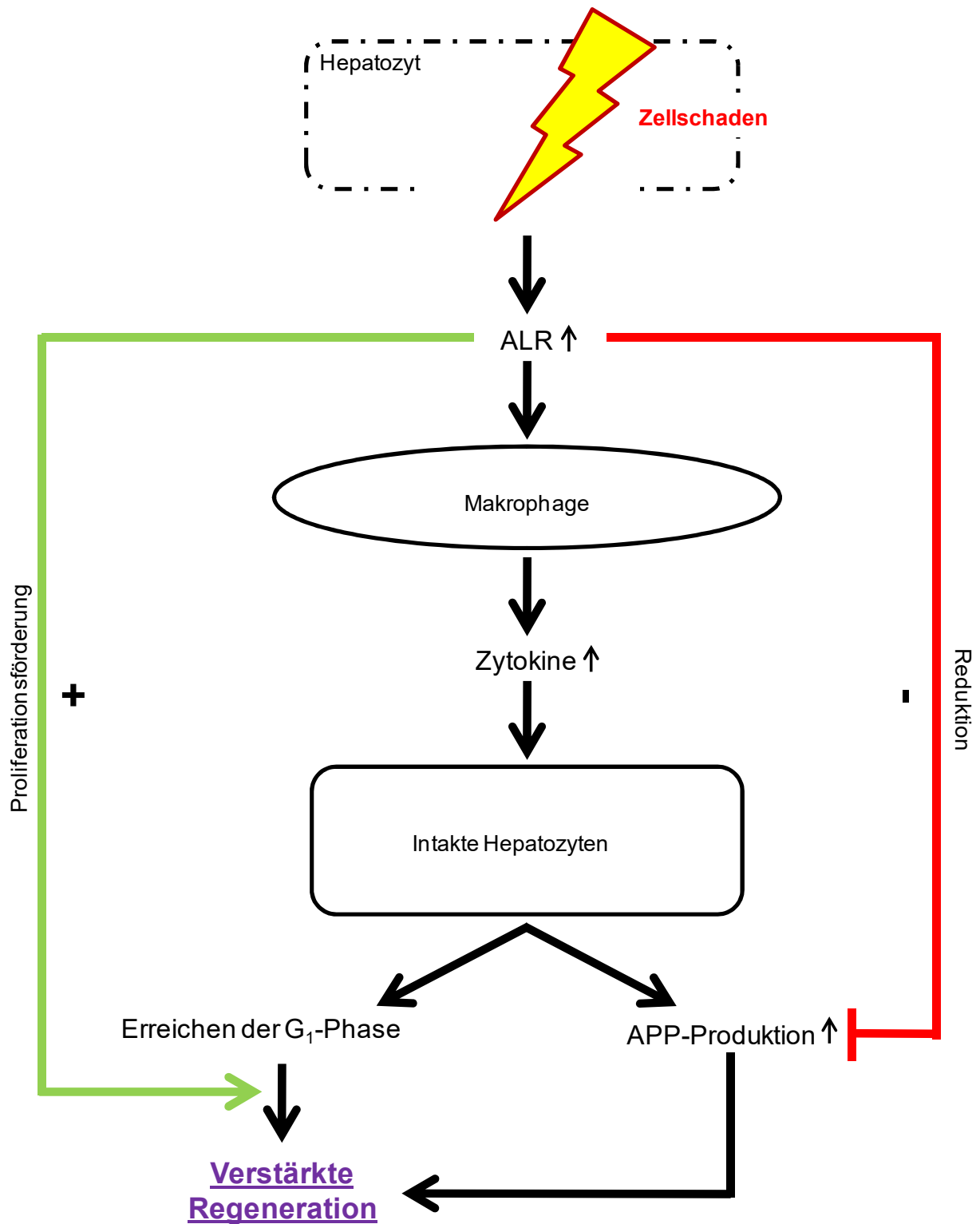
Erhöhte Konzentrationen von ALRp im Serum nach zellschädigenden Einflüssen legen eine Funktion von ALR nahe, die mit der von sogenannten DAMPs vergleichbar ist. So wird ALR also als Zeichen von Zellschädigung, zellulärem Stress oder bei Zelluntergang freigesetzt (Vodovotz 2012). Diese Tatsache lässt unter Anbetracht der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse folgende Hypothese zu: Die lokal erhöhten Konzentrationen von ALRp könnten auf Makrophagen, nicht nur auf gewebstän-

dige, sondern auch auf systemisch zirkulierende wirken, und führen in Folge zu einer erhöhten Expression von Zytokinen. Diese erhöhte Konzentration von Zytokinen überführt die normalerweise in der G<sub>0</sub>-Phase ruhenden Hepatozyten in die aktive G<sub>1</sub>-Phase (Fausto 1995). In diesen Hepatozyten zeigt sich eine weitere Wirkung des vermehrt freigesetzten ALRp. Dieses fördert nicht nur die Zytokinproduktion von Makrophagen, sondern auch die DNA-Synthese und Proliferation von aktivierten Hepatozyten (Wang 1999a). ALRp vermittelt somit nicht nur als Comitogen den Übergang der Zelle aus der G<sub>1</sub>-Phase in die S-Phase des Zellzyklus, sondern kann durch die Zytokinfreisetzung aus Makrophagen auch zur Initiierung der Proliferation von Hepatozyten und somit zur Leberregeneration beitragen. Diese zwei Mechanismen belegen die große Bedeutung von ALR für den Prozess der Regeneration. Auch intrazellulär vorkommendes ALRp scheint auf die Empfindlichkeit der Leberzellen gegenüber IL-6 einen Einfluss zu besitzen. So könnte also auch das intrazellulär vorkommende Protein die Regeneration dadurch fördern.

Da es aber durch einen zellschädigenden Reiz im Organismus, zum Beispiel durch eine Operation, erst zu einer Notwendigkeit der Leberregeneration kommt, sind auch andere Auswirkungen dieses Reizes auf den Körper und deren Auswirkungen auf die Leberregeneration zu betrachten. Eine elementare Reaktion des Organismus in diesem Sachverhalt ist die sogenannte APR, im Rahmen derer es zu einer vermehrten Proteinbiosynthese von APPs kommt. Diese Proteinbiosynthese der APPs verbraucht die zellulären Ressourcen so sehr, dass eine Reduktion der Synthese anderer Proteine, sogenannter negativer APPs, notwendig ist (Raynes 2005). Die erhöhte Proteinbiosynthese der APPs könnte jedoch auch die Regeneration der Leber negativ beeinflussen beziehungsweise behindern. Hier könnte nun die Bedeutung der Reduktion der APP-Produktion durch extrazelluläres ALRp einzuordnen sein. Einerseits führt das Protein zur erhöhten Proliferation der Hepatozyten, andererseits reduziert es die Biosynthese von APPs, und stellt somit mehr Ressourcen der zellulären Proteinbiosynthese für die Zellproliferation zur Verfügung. Da, wie aus dem Kapitel 1.4.5 ersichtlich, die APPs jedoch eine wesentliche Rolle im Rahmen der Bewältigung einer inflammatorischen Reaktion des Körpers und deren Ursache spielen, wäre eine komplette Reduktion deren verstärkten Expression für die Prozesse der Wundheilung und so weiter kontraproduktiv. ALRp führt aber in der vorliegenden Arbeit nicht zu einer kompletten Reduktion, sondern verringert die APP-Produktion um etwa 30% bis 40%. Es ist davon auszugehen, dass der modulierende Effekt von ALR auf die IL-6-

Wirkung bezüglich der APP-Produktion auf die pathophysiologischen Bedürfnisse des Organismus abgestimmt ist. Es reduziert die APP-Produktion derart, um eine gesteigerte Proliferation der Leberzellen zu ermöglichen, führt aber nicht zu einer vollständigen Reduktion der APPs und ermöglicht somit, dass diese noch ihre speziellen Wirkungen/Aufgaben vermitteln/erfüllen können.

Alle in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind somit mit der bekannten proliferationsfördernden Eigenschaft von ALR zu vereinbaren. Es kann durch vermehrte Zytokinexpression in Makrophagen das Priming der Hepatozyten unterstützen und stellt durch die Reduktion der APP-Produktion vermehrt Ressourcen für Zellwachstum und -teilung zur Verfügung. Da ähnliche Wirkungen auch von anderen Wachstumsfaktoren der Leber bekannt sind, kann dieser Sachverhalt einen allgemeinen Mechanismus der hepatischen Proliferationsförderung durch diese Faktoren darstellen. Die Abbildung 30 bietet einen Überblick über die Bedeutung der beobachteten Effekte von ALR.



**Abbildung 30:** Die Rolle von ALR im Rahmen der APR und Proliferation/Regeneration der Leber. Durch einen Zellschaden kommt es zur Freisetzung von ALRp. ALRp erhöht nun die Produktion von Zytokinen in Makrophagen, welche einerseits die Hepatozyten in die G<sub>1</sub>-Phase überführen, andererseits auch die APP-Produktion steigern. Bei ersterem Effekt greift ALR fördernd ein, bei letzterem hemmend. Beide Auswirkungen führen aber zu einer verstärkten Proliferation bzw. Regeneration der Hepatozyten.

#### 4.4 Klinische Bedeutung der Wirkung von ALRp

Die beobachtete Wirkung auf die Expression von APPs durch ALR ist auch von klinischer Bedeutung.

Ein Beispiel in der erhöhte APP-Konzentrationen als ursächlich für die Pathogenese einer Erkrankung angesehen werden, ist die Amyloidose. Von ihr gibt es mehrere Unterformen. Diese sind durch die Ablagerung unterschiedlicher Proteine im Gewebe gekennzeichnet. Eines der landläufig bekanntesten Beispiele ist Morbus Alzheimer. Bei dieser Erkrankung führen Aggregationen von Amyloid  $\beta$  zu einer Einschränkung der cerebralen Funktionstüchtigkeit. Neben dieser gibt es jedoch auch eine weitere Form der Amyloidose, in der es im Rahmen chronischer Entzündungen zu einer Ablagerung von fehlgefalteten SAA-Proteinen im Gewebe kommt - als AA-Amyloidose bezeichnet. Dies ist zum Beispiel im Rahmen von Spondylitiden, psoriatischer Arthritis, Morbus Chron oder periodischen Fiebersyndromen der Fall. Durch die Ablagerung dieser Proteine kommt es folglich zu einer Funktionsbeeinträchtigung unterschiedlicher Organe, dies wird besonders in der Niere, im Darm, im Gefäßsystem oder auch im Herzen beobachtet. Moderne Therapiestrategien zur Vermeidung einer Amyloidose zielen auf die Blockade von TNF oder IL-6 ab (Westermarck 2015).

Für das aufgrund des Diagnosezeitpunktes besonders in der Pädiatrie relevanten familiärem Mittelmeerfieber, als bekanntesten Vertreter der hereditären periodischen Fiebersyndrome, ist die Entwicklung einer AA-Amyloidose von entscheidender Bedeutung für die Prognose der Erkrankung. Im Rahmen des Mittelmeerfiebers kommt es zu heftigen Schmerzepisoden unter anderem mit abdominellen Symptomen, aber auch in symptomfreien Intervallen konnten erhöhte APP-Konzentrationen gemessen werden, welche zur Entwicklung einer Amyloidose beitragen (Ben-Zvi 2011). Der Einsatz von Antikörpern gegen Zytokine zeigt hier einen positiven Einfluss auf das Fortschreiten der Erkrankung (Okuda 2014). Mechanismus einer Zytokinreduktion ist eine verringerte Produktion von APPs. Wie aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ersichtlich ist, ist auch ALR in der Lage, die Expression von SAA und der Sekretion dieses Proteins zu reduzieren. Der Einsatz von ALR wäre folglich eine weitere therapeutische Option in der Behandlung der AA-Amyloidose. Zu dieser Wirkung kommt ein protektiver Effekt von ALR gegenüber zellulären Stress hinzu, der bis heute vor allem in der Leber, aber auch in Gliagewebe oder der Niere untersucht wurde.

Dieser Effekt könnte ein weiterer positiver auf den Verlauf der Schmerzepisoden im Rahmen des familiären Mittelmeerfiebers sein.

Ein weiteres klinisches Anwendungsgebiet von ALRp im Bezug auf die Reduktion von APPs könnte auch die Hyperfibrinogenämie darstellen. Im Rahmen des metabolischen Syndroms, welches in der westlichen Bevölkerung an zunehmender Bedeutung gewinnt, aber auch im Rahmen von Verbrennungen, Tumoren oder einer Urämie kommt es zu Erhöhung von Fibrinogen (Bruno 2001; Goldsmith 2001; Levin 2010; Shu 2014). Die Folge dieser Hyperfibrinogenämie ist zum Beispiel ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse oder Schlaganfälle (Ernst 1993; Qizilbash 1991; Schoebel 1997; Wilhelmsen 1984). Im Rahmen der Tumorthherapie unterschiedlicher Organsystem, auch beim HCC, wird eine erhöhte Konzentration von Fibrinogen als negativ prognostischer Marker angesehen, unter anderem auch da Fibrin(-ogen) einen Einfluss auf die Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition nehmen kann (Fang 2012; Feng 2016; Kinoshita 2013; Qi 2015; Shu 2014).

Im Umkehrschluss geht eine Senkung der Hyperfibrinogenämie zum Beispiel mit Bezafibrat mit einer Reduktion von großen kardiovaskulären Ereignissen einher, auch nach bereits stattgefundenen Myokardinfakten (Madrid-Miller 2010). Ähnliches zeigt sich auch bei Einsatz von Batroxobin zur sekundär Prävention von Schlaganfällen (Xu 2007).

Extrazeuallüäres ALRp könnte hier eine völlig neue Therapieoption darstellen, welche mehrere positive Auswirkungen besitzen kann. Es führt zu einer Senkung der Fibrinogen-Produktion und Sekretion und könnte somit das Risiko für kardiovaskuläre und andere ischämische Ereignisse senken. Andererseits besitzt es auch einen antimetastatischen Effekt, der im HCC gezeigt werden konnte (Dayoub 2011), welcher zumindest teilweise auch auf die Fibrinogenreduktion durch ALR beruhen könnte. Der Einsatz von ALRp könnte somit das Outcome von Myokardinfarkt- oder Schlaganfallpatienten verbessern. Auch in der Tumorthherapie, besonders von HCC, bietet ALR neue Ansatzpunkte, welche Metastasierung, Progression und somit letztendlich die Letalität positiv beeinflussen könnten. Hervorzuheben ist, dass ALRp in den vorliegenden Ergebnissen nicht zu einer kompletten Reduktion von Fibrinogen geführt hat, somit also eine physiologische Hämostase potentiell noch möglich wäre.

## 5. Zusammenfassung

ALR ist als ein leberregenerationsförderndes Protein mit Auswirkungen auf die Viabilität von Hepatozyten beschrieben worden. In den vergangenen Jahren zeigten etliche Untersuchungen auch einen Einfluss dieses Proteins auf das Entzündungsgeschehen in der Leber, aber auch in anderen Organen. Auch von anderen Wachstumsfaktoren der Leber ist eine inflammationsmodulierende Wirkung bekannt. Ziel dieser Arbeit war es nun die Auswirkungen sowohl von extra- als auch intrazellulärem ALRp auf die Produktion von APPs genauer zu untersuchen. Ebenso sollte die Wirkung von ALR auf nichtgewebsständige Makrophagen-Zelllinien genauer betrachtet werden und mit den bisher gewonnen Erkenntnissen verglichen werden. Hierzu wurde einerseits die mRNA-Expression von APPs in HepG2-Zellen und sf-ALR-HepG2-Zellen nach IL-6- und ALRp-Stimulation mittels RT-PCR analysiert. Ebenso wurde mittels ELISA die Konzentration von APPs in den Zellkulturüberstand bestimmt. Um potentielle Signalwege der Vermittlung des Effektes von ALR zu bestimmen, wurden verschiedene Inhibitoren einzelner Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren eingesetzt, ebenso wurde der Phosphorylierungsgrad von STAT3 mittels Western-Blot analysiert.

Desweiteren wurden auch Untersuchungen mit der nicht-gewebsständigen Maus-Makrophagen-Zelllinie RAW vorgenommen. Hier wurde die mRNA-Expression von Zytokinen nach LPS- und IL-6-Stimulation analysiert. Ebenso kam es zum Einsatz unterschiedlicher Inhibitoren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres ALRp zu einer erhöhten Zytokin-mRNA-Expression auch in nicht-gewebsständigen Makrophagen führt. Dies unterstützt im Rahmen der Leberregeneration das sogenannte "*Priming*", welches die Proliferation von Hepatozyten erst ermöglicht. In einem weiteren Schritt reduziert ALRp die APP-Expression im Hepatozyten und könnte somit Ressourcen, welche sonst durch eine APR verbraucht würden, für die Leberregeneration zur Verfügung stellen. Somit unterstützt ALRp an mehreren Punkten die hepatische Proliferation. Parallelen finden sich hier vor allem zu dem Wachstumsfaktor EGF. Als potentielle Signalkaskade, mit der die ALR-Wirkung übermittelt wird, wurde ERK1/2 identifiziert. Dies verhält sich ebenfalls analog zu den Erkenntnissen, welche von EGF bekannt sind. Ein Einfluss auf die STAT3-Phosphorylierung konnte unter den in dieser Arbeit gegebenen Bedingungen nicht beobachtet werden, jedoch zeigte sich in weite-

ren Untersuchungen eine verringerte STAT3-Phosphorylierung nach Zugabe von extrazellulärem ALRp zu mit IL-6-stimulierten HepG2-Zellen (Dayoub 2017). In Zellen mit einer Überexpression von intrazellulärem ALR kam es zu einer verstärkten mRNA-Expression und Proteinsekretion der APPs Haptoglobin und Fibrinogen. Dies könnte Ausdruck einer allgemein verstärkten Empfindlichkeit von Zellen, mit erhöhtem intrazellulärem ALRp, gegenüber IL-6 sein. Diese erhöhte Reaktionsbereitschaft könnte im Rahmen der Leberregeneration unterstützend wirken.

Klinisch von Bedeutung sind die gewonnenen Ergebnisse vor allem im Rahmen von chronisch-entzündlichen Erkrankungen, zum Beispiel dem familiären Mittelmeerfieber, bei welchen es in Folge der permanenten Inflammation zu einer vermehrten SAA-Produktion und -Ablagerung im Gewebe kommt. Aus Folge daraus entsteht der Symptomkomplex der Amyloidose. Auch im Rahmen der Hyperfibrinogenämie, welche bei Tumoren, kardiovaskulären und anderen ischämischen Ereignissen eine negative Auswirkung auf das Überleben von Patienten besitzt, kann ALR durch Senkung der APP-Produktion über mehrere Mechanismen positiv Einfluss auf die Mortalität, das Outcome, nehmen. Die Erforschung der klinischen Einsetzbarkeit dieses Wachstumsfaktors könnte so neue Therapieoptionen bieten und bestehende therapeutische Möglichkeiten verbessern oder erweitern.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ahmed, M. S., Jadhav, A. B., Hassan, A. Meng, Q. H. 2012. Acute phase reactants as novel predictors of cardiovascular disease. *ISRN inflammation* 2012, 953461.
- Akerman, P., Cote, P., Yang, S. Q., McClain, C., Nelson, S., Bagby, G. J. Diehl, A. M. 1992. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *The American journal of physiology* 263(4 Pt 1), G579-85.
- Albrecht, U., Yang, X., Asselta, R., Keitel, V., Tenchini, M. L., Ludwig, S., Heinrich, P. C., Häussinger, D., Schaper, F. Bode, J. G. 2007. Activation of NF-kappaB by IL-1beta blocks IL-6-induced sustained STAT3 activation and STAT3-dependent gene expression of the human gamma-fibrinogen gene. *Cellular signalling* 19(9), 1866–1878.
- Bauer, K. A. Rosenberg, R. D. 1991. Role of antithrombin III as a regulator of in vivo coagulation. *Seminars in hematology* 28(1), 10–18.
- Ben-Zvi, I. Livneh, A. 2011. Chronic inflammation in FMF: markers, risk factors, outcomes and therapy. *Nature reviews. Rheumatology* 7(2), 105–112.
- Bode, J. G., Albrecht, U., Häussinger, D., Heinrich, P. C. Schaper, F. 2012. Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-κB-dependent signaling. *European journal of cell biology* 91(6-7), 496–505.
- Brüning, A., Homann, N., Preuss, R. Wellhöner, P. 2013. Leber, Galle, Pankreas, in Renz-Polster, H. & Krautzig, S. (Hg.): *Basislehrbuch Innere Medizin*. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 575–669.
- Bruno, G., Cavallo-Perin, P., Bargero, G., Borra, M., D'Errico, N., Macchia, G. Paganò, G. 2001. Hyperfibrinogenemia and metabolic syndrome in type 2 diabetes: a population-based study. *Diabetes/metabolism research and reviews* 17(2), 124–130.
- Cardoso, L. S., Araujo, M. I., Góes, A. M., Pacífico, L. G., Oliveira, R. R. Oliveira, S. C. 2007. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microbial cell factories* 6, 1.
- Castell, J., Klapproth, J., Gross, V., Walter, E., Andus, T., Snyers, L., Content, J. Heinrich, P. C. 1990. Fate of interleukin-6 in the rat. Involvement of skin in its catabolism. *European journal of biochemistry / FEBS* 189(1), 113–118.

- Castell, J. V., Geiger, T., Gross, V., Andus, T., Walter, E., Hirano, T., Kishimoto, T. Heinrich, P. C. 1988. Plasma clearance, organ distribution and target cells of interleukin-6/hepatocyte-stimulating factor in the rat. *European journal of biochemistry / FEBS* 177(2), 357–361.
- Chen, X., Li, Y., Wei, K., Li, L., Liu, W., Zhu, Y., Qiu, Z. He, F. 2003. The potentiation role of hepatopoietin on activator protein-1 is dependent on its sulfhydryl oxidase activity. *The Journal of biological chemistry* 278(49), 49022–49030.
- Cheng, J., Zhong, Y.-W., Liu, Y., Dong, J., Yang, J.-Z. Chen, J.-M. 2000. Cloning and sequence analysis of human genomic DNA of augmenter of liver regeneration. *World journal of gastroenterology : WJG* 6(2), 275–277.
- 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 (New York, N.Y.)* 278(5344), 1803–1805.
- Dayoub, R. 2009. Expression and Regulation of liver regeneration associated protein ALR under patho-physiological conditions. Dissertation. Universität Regensburg. URL: urn:nbn:de:bvb:355-opus-13359.
- Dayoub, R., Buerger, L., Ibrahim, S., Melter, M. Weiss, T. S. 2017. Augmenter of liver regeneration (ALR) exhibits a dual signaling impact on hepatic acute-phase response. *Experimental and molecular pathology* 102(3), 428–433.
- Dayoub, R., Grottl, P., Dobner, T., Bosserhoff, A. K., Schlitt, H.-J. Weiss, T. S. 2010. Foxa2 (HNF-3beta) regulates expression of hepatotrophic factor ALR in liver cells. *Biochemical and biophysical research communications* 395(4), 465–470.
- Dayoub, R., Thasler, W. E., Bosserhoff, A. K., Singer, T., Jauch, K.-W., Schlitt, H. J. Weiss, T. S. 2006. Regulation of polyamine synthesis in human hepatocytes by hepatotrophic factor augmenter of liver regeneration. *Biochemical and biophysical research communications* 345(1), 181–187.
- Dayoub, R., Vogel, A., Schuett, J., Lupke, M., Spieker, S. M., Ketter, N., Hildt, E., Melter, M. Weiss, T. S. 2013. Nrf2 activates augmenter of liver regeneration (ALR) via antioxidant response element and links oxidative stress to liver regeneration. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 19, 237–244.
- Dayoub, R., Wagner, H., Bataille, F., Stöltzing, O., Spruss, T., Buechler, C., Schlitt, H.-J. Weiss, T. S. 2011. Liver regeneration associated protein (ALR) exhibits antitumorigenic potential in hepatocellular carcinoma. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 17(3-4), 221–228.

- Dittrich, E., Haft, C. R., Muys, L., Heinrich, P. C. Graeve, L. 1996. A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor. *The Journal of biological chemistry* 271(10), 5487–5494.
- Dittrich, E., Rose-John, S., Gerhartz, C., Müllberg, J., Stoyan, T., Yasukawa, K., Heinrich, P. C. Graeve, L. 1994. Identification of a region within the cytoplasmic domain of the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 important for ligand-induced endocytosis of the IL-6 receptor. *The Journal of biological chemistry* 269(29), 19014–19020.
- Doolittle, R. F. 1984. Fibrinogen and fibrin. *Annual review of biochemistry* 53, 195–229.
- Drenckhahn, D. Fahimi, D. 2008. Leber und Gallenblase, in Drenckhahn, D. (Hg.): *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. (Zellen- und Gewebslehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem, 1), 697–720.
- Drew, A. F., Liu, H., Davidson, J. M., Daugherty, C. C. Degen, J. L. 2001. Wound-healing defects in mice lacking fibrinogen. *Blood* 97(12), 3691–3698.
- Ernst, E. Resch, K. L. 1993. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Annals of internal medicine* 118(12), 956–963.
- Fang, C.-C., Huang, J.-W., Shyu, R.-S., Yen, C.-J., Shiao, C.-H., Chiang, C.-K., Hu, R.-H. Tsai, T.-J. 2012. Fibrin-Induced epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells as a mechanism of peritoneal fibrosis: effects of pentoxifylline. *PloS one* 7(9), e44765.
- Farrell, S. R. Thorpe, C. 2005. Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity. *Biochemistry* 44(5), 1532–1541.
- Fausto, N. 2000. Liver regeneration. *Journal of hepatology* 32(1 Suppl), 19–31.
- Fausto, N., Laird, A. D. Webber, E. M. 1995. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9(15), 1527–1536.

- Feng, Z., Wen, H., Bi, R., Duan, Y., Yang, W. Wu, X. 2016. Thrombocytosis and hyperfibrinogenemia are predictive factors of clinical outcomes in high-grade serous ovarian cancer patients. *BMC cancer* 16, 43.
- Fish, R. J. Neerman-Arbez, M. 2012. Fibrinogen gene regulation. *Thrombosis and haemostasis* 108(3), 419–426.
- Francavilla, A., Barone, M., Van Thiel, D H, Mazzaferro, V., Prelich, J. G. Starzl, T. E. 1991. Further steps of hepatic stimulatory substance purification. *Digestive diseases and sciences* 36(5), 674–680.
- Francavilla, A., Hagiya, M., Porter, K. A., Polimeno, L., Ihara, I. Starzl, T. E. 1994. Augmenter of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 20(3), 747–757.
- Francavilla, A., Ove, P., Polimeno, L., Coetzee, M., Makowka, L., Rose, J., Van Thiel, D H Starzl, T. E. 1987. Extraction and partial purification of a hepatic stimulatory substance in rats, mice, and dogs. *Cancer research* 47(21), 5600–5605.
- Francavilla, A., Vujanovic, N. L., Polimeno, L., Azzarone, A., Iacobellis, A., DeLeo, A., Hagiya, M., Whiteside, T. L. Starzl, T. E. 1997. The in vivo effect of hepatotrophic factors augmenter of liver regeneration, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factor-II on liver natural killer cell functions. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 25(2), 411–415.
- Gadola, S. D. 2012. Die Akut-Phase-Reaktion, in Peter, H.-H., Pichler, W. J. & Müller-Ladner, U. (Hg.): *Klinische Immunologie*. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 11–15.
- Gandhi, C. R. 2012. Augmenter of liver regeneration. *Fibrogenesis & tissue repair* 5(1), 10.
- Gandhi, C. R., Kuddus, R., Subbotin, V. M., Prelich, J., Murase, N., Rao, A. S., Naleznik, M. A., Watkins, S. C., DeLeo, A., Trucco, M. Starzl, T. E. 1999. A fresh look at augmenter of liver regeneration in rats. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 29(5), 1435–1445.
- Gandhi, C. R., Murase, N. Starzl, T. E. 2010. Cholera toxin-sensitive GTP-binding protein-coupled activation of augmenter of liver regeneration (ALR) receptor and its function in rat kupffer cells. *Journal of cellular physiology* 222(2), 365–373.
- Geerts, W. H. 1996. Thromboembolism in trauma: the problem and its prevention. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 22 Suppl 2, 19-24; discussion 29-30.

- Gekle, M. 2010. Funktionen des Magen-Darm-Trakts, Energiehaushalt und Ernährung, in Klinke, R., u.a. (Hg.): *Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme, 416–497.
- Giorda, R., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sakai, H., Michaelson, J., Francavilla, A., Starzl, T. E. Trucco, M. 1996. Analysis of the structure and expression of the augmentor of liver regeneration (ALR) gene. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 2(1), 97–108.
- Goldsmith, D. J. Covic, A. 2001. Coronary artery disease in uremia: Etiology, diagnosis, and therapy. *Kidney international* 60(6), 2059–2078.
- Gordon, S., Cleve, H. Bearn, A. G. 1968. An improved method of preparing haptoglobin polypeptide chains using guanidine hydrochloride. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 127(1), 52–59.
- Guillén, M. I., Gómez-Lechón, M. J., Nakamura, T. Castell, J. V. 1996. The hepatocyte growth factor regulates the synthesis of acute-phase proteins in human hepatocytes: divergent effect on interleukin-6-stimulated genes. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 23(6), 1345–1352.
- Hagiya, M., Francavilla, A., Polimeno, L., Ihara, I., Sakai, H., Seki, T., Shimonishi, M., Porter, K. A. Starzl, T. E. 1994. Cloning and sequence analysis of the rat augmentor of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(17), 8142–8146.
- Hagiya, M., Francavilla, A., Polimeno, L., Ihara, I., Sakai, H., Seki, T., Shimonishi, M., Porter, K. A. Starzl, T. E. 1995. Cloning and sequence analysis of the rat augmentor of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(7), 3076.
- Hales, D. B., Diemer, T. Hales, K. H. 1999. Role of cytokines in testicular function. *Endocrine* 10(3), 201–217.
- Häussinger, D. Löffler, G. 2007. Leber, in Löffler, G., Heinrich, P. C. & Petrides. P. (Hg.): *Biochemie & Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer, 1083–1102.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F. Graeve, L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal* 334 (Pt 2), 297–314.

- Heinrich, P. C., Castell, J. V. Andus, T. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *The Biochemical journal* 265(3), 621–636.
- Higashitsuji, H., Arii, S., Furutani, M., Mise, M., Monden, K., Fujita, S., Ishiguro, S., Kitao, T., Nakamura, T. Nakayama, H. 1995. Expression of cytokine genes during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *The Journal of surgical research* 58(3), 267–274.
- Higgins, G. 1931. Experimental pathology of liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*(12), 186–202.
- Horn, F., Lütticken, C., Wegenka, U., Yuan, J. Heinrich, P. C. 1995. IL-6 signal transduction from the plasma membrane to the nucleus, in Gerok, W., u.a. (Hg.): *CYTOKINES AND THE LIVER: Proceedings of the 78th Falk Symposium (Part II of the Gastroenterology Week Freiburg 1994), held in Freiburg-im-Breisgau, Germany, Junde 15-16, 1994*: Springer, 14–28.
- Ilowski, M., Putz, C., Weiss, T. S., Brand, S., Jauch, K.-W., Hengstler, J. G. Thasler, W. E. 2010. Augmenter of liver regeneration causes different kinetics of ERK1/2 and Akt/PKB phosphorylation than EGF and induces hepatocyte proliferation in an EGF receptor independent and liver specific manner. *Biochemical and biophysical research communications* 394(4), 915–920.
- Ilowski, M., Weiss, T. S., Stadler, F., Toni, E. de, Jauch, K.-W., Rentsch, M. Thasler, W. 2009. Der hepatotrophe Wachstumsfaktor Augmenter of liver regeneration (ALR) wirkt leberspezifisch protektiv gegenüber metabolischen Noxen, vermittelt über den PI3K/AKT Signalweg. In: SCHUMPELICK, V., BRUCH, H.-P. & Hans Konrad Schackert: *Chirurgisches Forum und DGAV 2009: für experimentelle und klinische Forschung 126.Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München, 28.4.-1.5.2009 (Deutsche Gesellschaft für Chirurgie)*. Schumpelick, V., Hrsg., 199–200.
- Jain, N., Zhang, T., Fong, S. L., Lim, C. P. Cao, X. 1998. Repression of Stat3 activity by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Oncogene* 17(24), 3157–3167.
- Kielar, M. L., John, R., Bennett, M., Richardson, J. A., Shelton, J. M., Chen, L., Jeyarajah, D. R., Zhou, X. J., Zhou, H., Chiquett, B., Nagami, G. T. Lu, C. Y. 2005. Maladaptive role of IL-6 in ischemic acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 16(11), 3315–3325.

- Kinoshita, A., Onoda, H., Imai, N., Iwaku, A., Oishi, M., Tanaka, K., Fushiya, N., Koike, K., Nishino, H., Matsushima, M. Tajiri, H. 2013. Elevated plasma fibrinogen levels are associated with a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 85(5), 269–277.
- Kishimoto, T. 2003. Interleukin-6 (IL-6), in Thomson, A. W. & Lotze, M. T. (Hg.): *The Cytokine Handbook*: Academic Press, 281–304.
- Klissenbauer, M., Winters, S., Heinlein, Uwe A O Lisowsky, T. 2002. Accumulation of the mitochondrial form of the sulphhydryl oxidase Erv1p/Alrp during the early stages of spermatogenesis. *The Journal of experimental biology* 205(Pt 14), 1979–1986.
- Kono, H. Rock, K. L. 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature reviews. Immunology* 8(4), 279–289.
- Krebs, D. L. Hilton, D. J. 2001. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 19(5), 378–387.
- Kristiansen, M., Graversen, J. H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H. J., Law, S. K. Moestrup, S. K. 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409(6817), 198–201.
- Kusunoki, H., Taniyama, Y., Otsu, R., Rakugi, H. Morishita, R. 2014. Anti-inflammatory effects of hepatocyte growth factor on the vicious cycle of macrophages and adipocytes. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 37(6), 500–506.
- LaBrecque, D. R. Pesch, L. A. 1975. Preparation and partial characterization of hepatic regenerative stimulator substance (SS) from rat liver. *The Journal of physiology* 248(2), 273–284.
- LaBrecque, D. R., Steele, G., Fogerty, S., Wilson, M. Barton, J. 1987. Purification and physical-chemical characterization of hepatic stimulator substance. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 7(1), 100–106.
- Lange, H., Lisowsky, T., Gerber, J., Mühlenhoff, U., Kispal, G. Lill, R. 2001. An essential function of the mitochondrial sulphhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO reports* 2(8), 715–720.
- Leven, K.-H. 2005. Leber, in Leven, K.-H. (Hg.): *Antike Medizin: Ein Lexikon*. München: C.H. Beck, 559–562.

- Levin, G. Y. Egorihina, M. N. 2010. The role of fibrinogen in aggregation of platelets in burn injury. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 36(6), 806–810.
- Li, Y., Li, M., Xing, G., Hu, Z., Wang, Q., Dong, C., Wei, H., Fan, G., Chen, J., Yang, X., Zhao, S., Chen, H., Guan, K., Wu, C., Zhang, C. He, F. 2000. Stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor by hepatopoietin. *The Journal of biological chemistry* 275(48), 37443–37447.
- Li, Y., Wei, K., Lu, C., Li, Y., Li, M., Xing, G., Wei, H., Wang, Q., Chen, J., Wu, C., Chen, H., Yang, S. He, F. 2002. Identification of hepatopoietin dimerization, its interacting regions and alternative splicing of its transcription. *European journal of biochemistry / FEBS* 269(16), 3888–3893.
- Li, Y., Xing, G., Wang, Q., Li, M., Wei, H., Fan, G., Chen, J., Yang, X., Wu, C., Chen, H. He, F. 2001. Hepatopoietin acts as an autocrine growth factor in hepatoma cells. *DNA and cell biology* 20(12), 791–795.
- Li, Y., Zhang, L., Liu, Q., Chen, G.-t. Sun, H. 2014. Exogenous augmenter of liver regeneration (ALR) attenuates inflammatory response in renal hypoxia re-oxygenation injury. *Renal failure* 36(3), 432–436.
- Liao, X.-h., Chen, G.-t., Li, Y., Zhang, L., Liu, Q., Sun, H. Guo, H. 2012. Augmenter of liver regeneration attenuates tubular cell apoptosis in acute kidney injury in rats: the possible mechanisms. *Renal failure* 34(5), 590–599.
- Liao, X.-h., Zhang, L., Liu, Q., Sun, H., Peng, C.-m. Guo, H. 2010. Augmenter of liver regeneration protects kidneys from ischaemia/reperfusion injury in rats. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 25(9), 2921–2929.
- Libermann, T. A. Baltimore, D. 1990. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Molecular and cellular biology* 10(5), 2327–2334.
- Lisowsky, T., Lee, J. E., Polimeno, L., Francavilla, A. Hofhaus, G. 2001. Mammalian augmenter of liver regeneration protein is a sulfhydryl oxidase. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 33(2), 173–180.

- Lisowsky, T., Weinstat-Saslow, D. L., Barton, N., Reeders, S. T. Schneider, M. C. 1995. A new human gene located in the PKD1 region of chromosome 16 is a functional homologue to ERV1 of yeast. *Genomics* 29(3), 690–697.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D. Shuai, K. 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(18), 10626–10631.
- Lu, C., Li, Y., Zhao, Y., Xing, G., Tang, F., Wang, Q., Sun, Y., Wei, H., Yang, X., Wu, C., Chen, J., Guan, K.-L., Zhang, C., Chen, H. He, F. 2002a. Intracrine hepatopietin potentiates AP-1 activity through JAB1 independent of MAPK pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16(1), 90–92.
- Lu, J., Xu, W.-X., Zhan, Y.-Q., Cui, X.-L., Cai, W.-M., He, F.-C. Yang, X.-M. 2002b. Identification and characterization of a novel isoform of hepatopietin. *World journal of gastroenterology : WJG* 8(2), 353–356.
- Mackiewicz, A., Speroff, T., Ganapathi, M. K. Kushner, I. 1991. Effects of cytokine combinations on acute phase protein production in two human hepatoma cell lines. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 146(9), 3032–3037.
- Madrid-Miller, A., Moreno-Ruiz, L. A., Borrayo-Sánchez, G., Almeida-Gutiérrez, E., Martínez-Gómez, D. F. Jáuregui-Aguilar, R. 2010. Impact of bezafibrate treatment in patients with hyperfibrinogenemia and ST-elevation acute myocardial infarction: a randomized clinical trial. *Cirugía y cirujanos* 78(3), 229–237.
- Mammen, E. F. 1998. Antithrombin: its physiological importance and role in DIC. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 24(1), 19–25.
- Michalopoulos, G. K. 1990. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 4(2), 176–187.
- Michalopoulos, G. K. 2014. Advances in liver regeneration. *Expert review of gastroenterology & hepatology* 8(8), 897–907.
- Migita, K., Kawabe, Y., Tominaga, M., Origuchi, T., Aoyagi, T. Eguchi, K. 1998. Serum amyloid A protein induces production of matrix metalloproteinases by human synovial fibroblasts. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 78(5), 535–539.
- Mosesson, M. W. 2005. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 3(8), 1894–1904.

- Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S. Kishimoto, T. 1997. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387(6636), 924–929.
- Natsuka, S., Isshiki, H., Akira, S. Kishimoto, T. 1991. Augmentation of haptoglobin production in Hep3B cell line by a nuclear factor NF-IL6. *FEBS letters* 291(1), 58–62.
- Nesbitt, J. E. Fuller, G. M. 1992. Dynamics of interleukin-6 internalization and degradation in rat hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 267(9), 5739–5742.
- Niessen, R. W., Lamping, R. J., Jansen, P. M., Prins, M. H., Peters, M., Taylor, F. B., de Vijlder, J J, ten Cate, J W, Hack, C. E. Sturk, A. 1997. Antithrombin acts as a negative acute phase protein as established with studies on HepG2 cells and in baboons. *Thrombosis and haemostasis* 78(3), 1088–1092.
- Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A. Kitano, H. 2005. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular systems biology* 1, 2005.0010.
- Okuda, M., Tokunaga, R. Taketani, S. 1992. Expression of haptoglobin receptors in human hepatoma cells. *Biochimica et biophysica acta* 1136(2), 143–149.
- Okuda, Y., Ohnishi, M., Matoba, K., Jouyama, K., Yamada, A., Sawada, N., Mokuda, S., Murata, Y. Takasugi, K. 2014. Comparison of the clinical utility of tocilizumab and anti-TNF therapy in AA amyloidosis complicating rheumatic diseases. *Modern rheumatology* 24(1), 137–143.
- Parvanov, M., Ilowski, M., Leise, J., Donabauer, B., Weiss, T. S., Jauch, K. W., Thasler, W. E. 2010. Der leberspezifische Wachstumsfaktor Augmenter of liver regeneration wirkt anti-inflammatorisch über STAT3/SOCS3 Inhibition in humanen Hepatozyten, in Grading, R. (Hg.): *Chirurgisches Forum und DGAV 2010 für experimentelle und klinische Forschung: 127. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin, 20.4.-23.4.2010*. Heidelberg: Springer Medizin, 211–212.
- Patnaik, M. M. Moll, S. 2008. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 14(6), 1229–1239.
- Penner, J. 1995. Antithrombin deficiency in special clinical syndromes--Part II: trauma/burns. *Seminars in hematology* 32(4 Suppl 2), 42-7; discussion 48.
- Polticelli, F., Bocedi, A., Minervini, G. Ascenzi, P. 2008. Human haptoglobin structure and function--a molecular modelling study. *The FEBS journal* 275(22), 5648–5656.

- Qi, Q., Geng, Y., Sun, M., Chen, H., Wang, P., Chen, Z. 2015. Hyperfibrinogen Is Associated With the Systemic Inflammatory Response and Predicts Poor Prognosis in Advanced Pancreatic Cancer. *Pancreas* 44(6), 977–982.
- Qizilbash, N., Jones, L., Warlow, C., Mann, J. 1991. Fibrinogen and lipid concentrations as risk factors for transient ischaemic attacks and minor ischaemic strokes. *BMJ (Clinical research ed.)* 303(6803), 605–609.
- Quaye, I. K. 2008. Haptoglobin, inflammation and disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102(8), 735–742.
- Raynes, J. G. 1994. Inhibition Of Serum Amyloid A Synthesis, in Kisilevsky, R., Benson, M. D., Frangione, B., Gauldie, J., Muckle, T. J., Young I. D. (Hg.): *Amyloid and amyloidosis 1993: The proceedings of the VIIth International Symposium on Amyloidosis, July 11-15, 1993, Kingston, Ontario, Canada*. New York: Parthenon Pub.
- Raynes, J. G. 2005. The acute phase response, in Topley, W., u.a. (Hg.): *Topley & Wilson's microbiology & microbial infections*. London: Hodder Arnold, 193–214.
- Riker, A. I., Gamelli, R. L. 1996. Vascular complications after femoral artery catheterization in burn patients. *The Journal of trauma* 41(5), 904–905.
- Saeed, S. A., Ahmad, N., Ahmed, S. 2007. Dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by human haptoglobin: its polymorphism and relation to hemoglobin binding. *Biochemical and biophysical research communications* 353(4), 915–920.
- Schirmacher, P., Dienes, H. P., Jochum, W., Trauner, M., Lackner, C. 2012. Leber und intrahepatische Gallenwege, in Böcker, W., u.a. (Hg.): *Pathologie*. Stuttgart: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 623–665.
- Schoebel, F. C., Gradaus, F., Ivens, K., Heering, P., Jax, T. W., Grabensee, B., Strauer, B. E., Leschke, M. 1997. Restenosis after elective coronary balloon angioplasty in patients with end stage renal disease: a case-control study using quantitative coronary angiography. *Heart (British Cardiac Society)* 78(4), 337–342.
- Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U. 2009. *Prometheus: LernAtlas der Anatomie*. 2. Aufl., 3 Bde. Stuttgart: Georg Thieme. (Innere Organe, 3).
- Sengupta, T. K., Talbot, E. S., Scherle, P. A., Ivashkiv, L. B. 1998. Rapid inhibition of interleukin-6 signaling and Stat3 activation mediated by mitogen-activated protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(19), 11107–11112.

- Shu, Y.-J., Weng, H., Bao, R.-F., Wu, X.-S., Ding, Q., Cao, Y., Wang, X.-A., Zhang, F., Xiang, S.-S., Li, H.-F., Li, M.-L., Mu, J.-S., Wu, W.-G., Liu, Y.-B. 2014. Clinical and prognostic significance of preoperative plasma hyperfibrinogenemia in gallbladder cancer patients following surgical resection: a retrospective and in vitro study. *BMC cancer* 14, 566.
- Sipe, J. 1999. Revised nomenclature for serum amyloid A (SAA). Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. Part 2. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 6(1), 67–70.
- Sonne, O., Davidsen, O., Møller, B. K., Munck Petersen, C. 1990. Cellular targets and receptors for interleukin-6. I. In vivo and in vitro uptake of IL-6 in liver and hepatocytes. *European journal of clinical investigation* 20(4), 366–376.
- Spies, M., Wolf, S. E., Barrow, R. E., Jeschke, M. G., Herndon, D. N. 2002. Modulation of types I and II acute phase reactants with insulin-like growth factor-1/binding protein-3 complex in severely burned children. *Critical care medicine* 30(1), 83–88.
- Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A., Hilton, D. J. 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387(6636), 917–921.
- Steel, D. M., Whitehead, A. S. 1994. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunology today* 15(2), 81–88.
- Tanigawa, K., Sakaida, I., Masuhara, M., Hagiya, M., Okita, K. 2000. Augmenter of liver regeneration (ALR) may promote liver regeneration by reducing natural killer (NK) cell activity in human liver diseases. *Journal of gastroenterology* 35(2), 112–119.
- Thasler, W. E., Dayoub, R., Mühlbauer, M., Hellerbrand, C., Singer, T., Gräbe, A., Jauch, K.-W., Schlitt, H.-J., Weiss, T. S. 2006. Repression of cytochrome P450 activity in human hepatocytes in vitro by a novel hepatotrophic factor, augmenter of liver regeneration. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 316(2), 822–829.
- Thirunavukkarasu, C., Wang, L. F., Harvey, Stephen A K, Watkins, S. C., Chaillet, J. R., Prelich, J., Starzl, T. E., Gandhi, C. R. 2008. Augmenter of liver regeneration:

- an important intracellular survival factor for hepatocytes. *Journal of hepatology* 48(4), 578–588.
- Uhlir, C. M. Whitehead, A. S. 1999. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *European journal of biochemistry / FEBS* 265(2), 501–523.
- Vodovotz, Y., Prelich, J., Lagoa, C., Barclay, D., Zamora, R., Murase, N. Gandhi, C. R. 2012. Augmenter of liver regeneration (ALR) is a novel biomarker of hepatocellular stress/inflammation: in vitro, in vivo and in silico studies. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 18, 1421–1429.
- Wang, G., Yang, X., Zhang, Y., Wang, Q., Chen, H., Wei, H., Xing, G., Xie, L., Hu, Z., Zhang, C., Fang, D., Wu, C. He, F. 1999a. Identification and characterization of receptor for mammalian hepatopoietin that is homologous to yeast ERV1. *The Journal of biological chemistry* 274(17), 11469–11472.
- Wang, Y., Kinzie, E., Berger, F. G., Lim, S. K. Baumann, H. 2001. Haptoglobin, an inflammation-inducible plasma protein. *Redox report : communications in free radical research* 6(6), 379–385.
- Wang, Y., Ripperger, J., Fey, G. H., Samols, D., Kordula, T., Wetzler, M., Van Etten, R A Baumann, H. 1999b. Modulation of hepatic acute phase gene expression by epidermal growth factor and Src protein tyrosine kinases in murine and human hepatic cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 30(3), 682–697.
- Wejman, J. C., Hovsepian, D., Wall, J. S., Hainfeld, J. F. Greer, J. 1984. Structure and assembly of haptoglobin polymers by electron microscopy. *Journal of molecular biology* 174(2), 343–368.
- Welsch, U. Thomas, D. 2010. *Lehrbuch Histologie*. 3. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Westermarck, G. T., Fändrich, M. Westermarck, P. 2015. AA amyloidosis: pathogenesis and targeted therapy. *Annual review of pathology* 10, 321–344.
- Wiedermann, C. J. Römisch, J. 2002. The anti-inflammatory actions of antithrombin-- a review. *Acta medica Austriaca* 29(3), 89–92.
- Wilhelmsen, L., Svärdsudd, K., Korsan-Bengtson, K., Larsson, B., Welin, L. Tibblin, G. 1984. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 311(8), 501–505.
- Wu, C.-K., Dailey, T. A., Dailey, H. A., Wang, B.-C. Rose, J. P. 2003. The crystal structure of augmenter of liver regeneration: A mammalian FAD-dependent

sulfhydryl oxidase. *Protein science : a publication of the Protein Society* 12(5), 1109–1118.

- Xu, G., Liu, X., Zhu, W., Yin, Q., Zhang, R. Fan, X. 2007. Feasibility of treating hyperfibrinogenemia with intermittently administered batroxobin in patients with ischemic stroke/transient ischemic attack for secondary prevention. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 18(2), 193–197.
- Yan, R., Li, Y., Zhang, L., Xia, N., Liu, Q., Sun, H. Guo, H. 2015a. Augmenter of liver regeneration attenuates inflammation of renal ischemia/reperfusion injury through the NF-kappa B pathway in rats. *International urology and nephrology* 47(5), 861–868.
- Yan, R., Zhang, L., Xia, N., Liu, Q., Sun, H. Guo, H. 2015b. Knockdown of augment-er of liver regeneration in HK-2 cells inhibits inflammation response via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*.
- Yang, X.-P., Albrecht, U., Zakowski, V., Sobota, R. M., Häussinger, D., Heinrich, P. C., Ludwig, S., Bode, J. G. Schaper, F. 2004. Dual function of interleukin-1beta for the regulation of interleukin-6-induced suppressor of cytokine signaling 3 expression. *The Journal of biological chemistry* 279(43), 45279–45289.
- Yawata, H., Yasukawa, K., Natsuka, S., Murakami, M., Yamasaki, K., Hibi, M., Taga, T. Kishimoto, T. 1993. Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *The EMBO journal* 12(4), 1705–1712.
- Zohlnhöfer, D., Graeve, L., Rose-John, S., Schooltink, H., Dittrich, E. Heinrich, P. C. 1992. The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand. *FEBS letters* 306(2-3), 219–222.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ALR	Augmenter of liver regeneration
ALRp	ALR-Protein
AP-1	Activating protein 1
APO A1	Apolipoprotein A1
APP	Akut-Phase-Protein
APR	Akut-Phase-Reaktion
AT 3/III	Antithrombin 3
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBM	cytocin binding modul
CD36	cluster of differentiation 36
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding proteins
c-fos SRE	c-fos serum response element
CRE	cAMP response element
CRP	C-reaktives Protein
CTGF	Connective tissue growth factor
DAMP	Damage associated molecular pattern
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fib.	Fibrinogen $\beta$

FOXA2	Forkhead-Box-Protein A2
G <sub>0/1</sub> -Phase	Gap <sub>0/1</sub> -Phase
gp130/80	Glykoprotein 130/80
GRF	Growth-regulating-factor
Hapto	Haptoglobin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDL	High-Density-Lipoprotein
HGF	Hepatocyte growth factor
HK-2 Zellen	Human kidney 2 Zellen
HNF	Hepatocyte nuclear factor
Ig	Immunglobulin
IGF	Insuline liked growth factor
IL-6/1 $\beta$ /1 $\alpha$ /12/8	Interleukin 6, 1 $\beta$ , 1 $\alpha$ , 12, 8
IL-6-DBP	IL-6-dependent DNA binding protein
IL-6R	IL-6 Rezeptor
IL-6 RE	IL-6 responsive element
INF $\beta$	Interferon $\beta$
Jab-1	Jun activating binding protein 1
Jak 1/2	Januskinase 1/2
Ktrl	Kontrolle
LAP	Liver-enriched transcriptional activator protein
IfALR	Long form augmenter of liver regeneration

LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
PDGF	Platelet derived growth factor
PIAS	Protein inhibitor of activated STAT
PKD1	polycystic kidney disease 1
PmB	Polymyxin B
RBP4	Retinol-binding protein 4
RCE	Renin core element
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
SAA2	Serum Amyloid A2
SDS	Sodium dodecyl sulphate
sfALR	Short form ALR
sgp	Soluble Glykoprotein
SH2-Domäne	Src-homology-2-Domäne
SHP2	Src Homology Phosphatase 2
sIL	Soluble Interleukin
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SOCS	Suppressor of cytokine signaling proteins

S-Phase	Synthese-Phase
SSI	STAT-induced STAT inhibitor
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TLR	Toll-like Receptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
tPa	Tissue plasminogen activator
Tyk 2	Tyrosinkinase 2

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Menschlicher Oberbauch-Situs.....	7
Abbildung 2: Histologie der Leber.....	9
Abbildung 3: Die ALR-Protein-Struktur.....	11
Abbildung 4: Die Signaltransduktion von ALR.....	13
Abbildung 5: Verlauf der Leberregeneration nach Zellschädigung.....	16
Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf einer APR.....	18
Abbildung 7: IL-6-Struktur im Ribbon-Modell.....	19
Abbildung 8: IL-6-Signaltransduktion.....	20
Abbildung 9: Die negative Regulation des IL-6-Signales.....	22
Abbildung 10: mRNA-Expression von APPs in HepG2 nach IL-6-Stimulation.....	47
Abbildung 11: mRNA Expression von Zytokinen in RAW-Zellen nach LPS-Stimulation.....	47
Abbildung 12: Zeitabhängigkeit der Zytokin-Expression in RAW-Zellen.....	49

Abbildung 13: Überprüfung von LPS-Verunreinigungen im rekombinanten ALRp....	51
Abbildung 14: Inhibition der Zytokin-Antwort auf LPS durch PmB-Zugabe.....	53
Abbildung 15 : Inhibition einzelner Signalwege von ALR in RAW-Zellen.....	55
Abbildung 16: Zeitabhängigkeit der APP-mRNA-Expression und des Einflusses von ALRp.....	57
Abbildung 17: Änderung der APP-mRNA-Expression in Abhängigkeit der ALRp- Konzentration .....	59
Abbildung 18: Vergleich der mRNA-Expression von APPs zwischen HepG2- und sfALR-HepG2-Zellen .....	61
Abbildung 19: Inhibition des p38-MAPK-Weges in ALR und IL-6 stimulierten HepG2-Zellen .....	62
Abbildung 20: NFκB-Inhibition in ALR und IL-6 stimulierten HepG2-Zellen.....	63
Abbildung 21: Inhibition von ERK 1/2 und EGFR unter ALRp- und IL-6-Stimulation in HepG2 .....	65
Abbildung 22: Der Einfluss von PD98059 auf die mRNA-Expression von APPs bei IL-6-Stimulation in HepG2.....	66
Abbildung 23: ERK 1/2 - pERK 1/2 - Western Blot .....	67
Abbildung 24: TYR-STAT3-Phosphorylierung in IL-6/ALR behandelten Zellen.....	68
Abbildung 25: SER-STAT3-Phosphorylierungsgrad in IL-6/ALR behandelten Zellen.....	69
Abbildung 26: pSTAT3/STAT3-Vergleich zwischen HepG2- und sfALR-HepG2- Zellen.....	70
Abbildung 27: STAT3-Dimerisierung im Vergleich zwischen HepG2- und sfALR- HepG2-Zellen .....	71
Abbildung 28: Bestimmung von Haptoglobin aus dem HepG2-Zellkultur-Überstand mittels ELISA.....	72

Abbildung 29: Vergleich der Haptoglobin-Sekretion von sfALR-HepG2- und HepG2-Zellen.....	73
--	----

Abbildung 30: Die Rolle von ALR im Rahmen der APR und Proliferation/Regeneration der Leber.....	83
---	----

## **9. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Auswirkungen der APR auf den Organismus.....	18
---	----

Tabelle 2: Überblick über die APPs .....	24
--	----

Tabelle 3: Humane Primerpaare für die in der linken Spalte aufgelisteten Gene .....	34
---	----

Tabelle 4: Maus-Primerpaare .....	35
-----------------------------------	----

Tabelle 5: Eingesetzte Konzentrationen und Vorinkubationszeiten verwendeter Substanzen.....	40
---	----

Tabelle 6: Bestimmung von Fibrinogen aus dem HepG2-Zellkultur-Überstand mittels ELISA.....	72
--	----

## 10. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Weiß bedanken für die Überlassung des Themas, die regelmäßigen Treffen, das ständige Hilfsangebot, die stets schnelle und problemlose Erreichbarkeit, aber auch für die Freiheit, eigene Gedanken und Ideen zuzulassen, ohne welche das ein oder andere gar nicht möglich gewesen wäre.

Auch bei dem ganzen Team der AG Weiß, insbesondere bei Rania Dayoub und Susanne Heyn, welche stets ein offenes Ohr für Alltägliches hatten und auch immer da waren, wenn sie gebraucht wurden, möchte ich mich herzlichst bedanken. Ein weiterer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern. Sie ermöglichten mir das Medizinstudium und waren immer Motivatoren.

Auch meiner Partnerin gebührt ein großer Dank, welche mich immer aufmunterte und mir das Leben an so manch einem langen Labor-Tag so angenehm wie gerade möglich gestaltete.

Zwei weiteren Personen gilt noch ein besonderer Dank: Meiner Großmutter, welche bei Start der Arbeit bereits das 93. Lebensjahr erreicht hatte. Trotz dieses hohen Alters war sie stets am Fortschritt der Arbeit, meinem Leben und meinen Plänen interessiert. Mit ihr konnte ich über alles Zukünftige reden.

Auch meiner Großtante soll an dieser Stelle Platz finden. Sie drückte mir immer die Daumen, dass auch alles gut klappen soll. Leider konnte sie die Vollendung der Arbeit nicht mehr miterleben.

## 11. Lebenslauf

## 12. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 17.04.2018

Leonhard Bürger

## 13. Publikationen

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Dayoub, R., Bürger, L., Ibrahim, S., Melter, M., Weiss, T. S. 2017. The liver regeneration associated factor ALR attenuates IL-6 induced acute-phase reactants during hepatic inflammation, GASL 2017

Dayoub, R., Buerger, L., Ibrahim, S., Melter, M. Weiss, T. S. 2017. Augmenter of liver regeneration (ALR) exhibits a dual signaling impact on hepatic acute-phase response. *Experimental and molecular pathology* 102(3), 428–433.