



Faculteit Wetenschappen
Academiejaar 2000 – 2001

**Onderzoek naar de rol van acute-fase proteïnen, in het
bijzonder α_1 -zuur glycoproteïne, in muismodellen voor
lokale en systemische inflammatie**

Tino Hochepped

Proefschrift voorgelegd tot het behalen van de graad van Doctor in de
Wetenschappen: Biotechnologie

Promotors: Prof. Dr. Peter Brouckaert
Prof. Dr. Claude Libert

Vakgroep Moleculaire Biologie
Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie

DANKUWEL

Oef, 't is eindelijk af. Of toch bijna. In de volgende paar regels zou ik nog een aantal mensen willen bedanken die op een rechtstreekse of onrechtstreekse manier bijgedragen hebben tot dit doctoraat.

Ik ben ongetwijfeld het meeste dank verschuldigd aan mijn rechtstreekse begeleider en mede-promotor, Prof. Dr. Claude Libert, die mij 1 jaar begeleid heeft tijdens mijn thesisjaar en het dan nog zag zitten om mij nog eens 5 jaar te coachen tijdens dit doctoraat. Ik heb het hem niet altijd even gemakkelijk gemaakt, vooral tijdens periodes waarin een aantal mislukte experimenten elkaar opvolgden, maar hij gaf me op tijd en stond de nodige motivatie om er terug met volle overtuiging in te vliegen. Ben Wielockx, al bijna 4 jaar mijn buurman in het labo, zou ik ook willen bedanken voor de vriendschap, de gesprekken over ons onderwerp, over het labo in het algemeen, voetbal, actualiteit, koetjes, kalfjes (en over beleggen op de beurs, maar die gesprekjes hebben ons beide niet veel opgebracht, integendeel).

De overige leden van onze recent onafhankelijk geworden Muis Moleculaire Genetica Unit, Dr. Wim Van Molle, Jan Staelens, Joke Vanden Berghe, Leen Puimège en Joke Steppe. Ook allen dankuwel voor de aangename werksfeer en de grote bereidwilligheid om altijd te helpen waar het kon.

Verder ook dankuwel aan de leden van de Moleculaire Pathofysiologie en Experimentele Therapie Unit, een monsterlijke naam, maar met allemaal brave mensen erin. In de eerste plaats dankuwel aan Prof. Dr. Peter Brouckaert om het promotorschap op zich te nemen en mij de volledige vrijheid te geven in mijn onderzoek. Dr. Paul Ameloot, Dr. Anje Cauwels, Manu Buys, Patrick Sips, Maureen Van den Hemel, Jeroen Hostens en An Goethals allen dankuwel voor alle hulp die ik gekregen heb.

De onmisbare mensen van onze muizen-creche, die de muizen bemoederen als waren het hun eigen kinderen, Myriam Goessens, Evelyn Spruyt, Linda van Geert en Tania Hauttekeete dankuwel; jullie maken ons werk een stuk eenvoudiger.

Ahmed Afennas, dankuwel omdat ik altijd op jou kon rekenen om experimenten uit te voeren in verband met de transgene faciliteit en omwille van de flexibiliteit om regelmatig in het weekend eens af te komen.

Prof. Dr. Roland Contreras, Prof. Dr. Frans Van Roy en oorspronkelijk Prof. Dr. Walter Fiers dankuwel om mij in het Departement Moleculaire Biologie mijn ding te laten doen, om initieel het promotorschap op zich te nemen (Prof. Dr. Roland Contreras) en om mij de kans te geven naast mijn doctoraat mij ook bezig te houden met de transgene faciliteit (Prof. Dr. Frans van Roy).

Onze kuisvrouw Erna, die niets liever had dan dat we vergadering hadden, zodat ze eens onze labo's een flinke kuisbeurt kon geven zonder dat iederen voor haar voeten liep.

Margino Steemans dankuwel voor de vriendschap en de ochtendlopen die me gans de dag energie gaven om verder te werken aan mijn doctoraatsthesis.

Dankuwel aan Rudy en Francis voor de sekwenties; Marcelle, Martine, en Kathleen voor de hulp bij het opzoeken van plasmiden in de databank, het ter beschikking stellen van hun copiemachine en allerlei software; Wim Drijvers voor de foto's van de muizen, de posters voor congressen en de kleurenafdrukken, Marita, Chantal en Sofie, voor alle administratieve aangelegenheden; Peter Vanhoenacker voor het coördineren van de voetbalploeg, en het wassen en strijken van de voetbaluitrusting; Maureen en Wilma voor de cytokine-bepalingen, Dr. Mieke Dewerchin (KULeuven) voor alle hulp en tips in verband met transgenen en knockouts,... Ik zou eigenlijk bijna iedereen van het departement kunnen vernoemen, want ik heb van zoveel mensen ofwel uitleg gekregen of een produkt dat bij ons op was, of gewoon een vriendelijk lachje...

Van het labo naar de persoonlijke sfeer is maar een kleine stap...

Dankuwel in de eerste plaats aan mijn vriendin Ilse, die gedurende al die jaren heel veel begrip en geduld heeft opgebracht voor het feit dat ik weer eens een hele avond in het labo zat of weer eens een hele avond achter de computer zat of artikeltjes moest lezen of weg moest op congres,... en ook dankuwel voor het verbeteren van de referenties.

Dankuwel aan mijn ouders, die mij al bijna dertig jaar in de watten leggen en altijd klaar staan voor mij. Dankuwel aan alle mensen van 'de Bosmolens' voor de jarenlange vriendschap, voor alle activiteiten die we al samen gedaan hebben, voor het begrip dat ik soms eens niet kon helpen of meedoen wegens te druk,... Een speciale dankuwel voor 'de voorzitter' Bert Tieghem, de drijvende kracht achter de minivoetbal, en altijd bereid om op vrijdagavond een pintje te gaan pakken op de markt in Izegem. Dankuwel aan Chiro Bosmolens, gedurende lange tijd een deel van mijn leven geweest en mij nog altijd nauw aan het hart liggend.

En verder...

Dankuwel aan Koen Windels, die tijdens mijn opleiding Industrieel Ingenieur meer punten had dan mij en daardoor de voorkeur kreeg om zijn stage en thesis te doen in het Izegems bedrijf Vandemoortele, waardoor ik mijn stage en thesis heb moeten doen in een van de overblijvende plaatsen, het (toen nog) Laboratorium voor Moleculaire Biologie, bij Prof. Dr. Erik Remaut en Dr. Nico Mertens; het prille begin van een wetenschappelijke carrière. Dankuwel aan Lena voor de verjaardagskaartjes en het oplossen van allerhande problemen. Dankuwel aan de vrienden uit het PIH voor de regelmatige bijeenkomsten ('Levretti', Stefaan, 'Pedro', Nick en Anja). Dankuwel aan mevrouw Rita en meneer Stefaan om mij vele jaren als begeleider te laten meegaan met het zesde leerjaar op bosklas naar Durbuy, de ideale vakantie voor mij.

Tenslotte wens ik mijn computer te bedanken om zich niet verslikt te hebben in de vele megabytes die zich in de volgende 160 blz. bevinden.

INHOUDSTABEL

INHOUDSTABEL	i
LIJST MET AFKORTINGEN	v
SITUERING EN SAMENVATTING VAN HET ONDERZOEK	1
HOOFDSTUK I – INLEIDING	7
I.1. INFLAMMATIE	7
I.1.1. Klinische aspecten van acute inflammatie	7
I.1.2. Overzicht van de inflammatoire respons	8
<i>I.1.2.1. Initiatie van de inflammatoire respons</i>	8
<i>I.1.2.2. Leukocyt adhesie aan het endotheel</i>	9
<i>I.1.2.3. Fysisch afdichten van beschadigde bloedvaten</i>	9
<i>I.1.2.4. Extravasatie naar de beschadigde weefsels</i>	10
I.1.3. Overzicht van een aantal inflammatoire mediators	10
I.1.4. Inductie van acute fase eiwit synthese	12
I.1.5. Lokale effecten van acute inflammatie	12
<i>I.1.5.1. Positieve effecten van acute inflammatie</i>	12
<i>I.1.5.2. Schadelijk effecten als gevolg van acute inflammatie</i>	14
I.1.6. Chronische inflammatie	14
I.2. DE ACUTE FASE RESPONS	15
I.2.1. Regulatie van de acute fase veranderingen	17
<i>I.2.1.1. Inductie van acute fase eiwitten</i>	17
<i>I.2.1.2. Veranderingen in het glycosylatiepatroon</i>	18
I.2.2. Regulatie van andere acute fase veranderingen	19
I.2.3. Beëindigen van de acute fase respons	19
I.2.4. Functie van de acute fase respons	20
I.2.5. Rol van acute fase eiwitten en enkele voorbeelden	21
<i>I.2.5.1. Verdediging van de gastheer</i>	21
<i>I.2.5.2. Inhibitoren van serine proteasen</i>	23
<i>I.2.5.3. Transporteiwitten met antioxidans activiteit</i>	23
<i>I.2.5.4. Rol van negatieve acute fase eiwitten</i>	24
I.3. α1-ZUUR GLYCOPROTEINE	25
I.3.1. Biochemische eigenschappen van AGP	25
I.3.2. AGP gen- en eiwitstructuur en expressie	26

<i>I.3.2.1. Humaan AGP</i>	26
<i>I.3.2.1.1. Gen- en eiwitstructuur</i>	26
<i>I.3.2.1.2. Expressie</i>	27
<i>I.3.2.2. Muis AGP</i>	27
<i>I.3.2.2.1. Gen- en eiwitstructuur</i>	27
<i>I.3.2.2.2. Expressie</i>	28
<i>I.3.2.3. Rat AGP</i>	29
<i>I.3.2.4. agp genduplicaties</i>	29
I.3.3. Expressie van de agp genen	30
<i>I.3.3.1. Plasma concentratie van AGP</i>	30
<i>I.3.3.2. Hormonale stimulatie van agp genexpressie in de lever</i>	31
<i>I.3.3.2.1. agp genregulatie bij de rat</i>	32
<i>I.3.3.2.1.1. Steroid responsieve unit en glucocorticoïd responsief element van het rat agp gen</i>	32
<i>I.3.3.2.1.2. Het Distaal Regulatorisch Element</i>	33
<i>I.3.3.2.1.3. Functionele relevantie van het Distaal Regulatorisch Element</i>	33
<i>I.3.3.2.2. agp genregulatie bij de muis</i>	34
<i>I.3.3.2.2.1. Het muis agp Glucocorticoïd Responsief Element</i>	34
<i>I.3.3.2.2.2. Het muis agp Acute Fase Responsief Element</i>	34
<i>I.3.3.2.2.3. Regulatie van agp gen expressie door andere moleculen/factoren</i>	35
<i>I.3.3.3. Extrahepatische agp genexpressie en –regulatie</i>	36
I.3.4. Glycosylatie van AGP	37
<i>I.3.4.1. Microheterogeniteit van de suikerketens op het AGP eiwit</i>	37
<i>I.3.4.1.1. 'Grote microheterogeniteit'</i>	37
<i>I.3.4.1.2. 'Kleine microheterogeniteit'</i>	39
<i>I.3.4.1.3. ConA reactiviteit van AGP</i>	39
<i>I.3.4.2. Glycosylatieveranderingen tijdens inflammatie</i>	40
<i>I.3.4.3. Regulatie van glycosylatiewijzigingen</i>	41
I.3.5. AGP serum concentratie en microheterogeniteit als merker/diagnose middel	41
I.3.6. AGP receptoren en biologische relevantie van de interactie	42
I.3.7. AGP als drug bindend eiwit	43
I.3.8. α_1 -Acid Glycoprotein: inflammatory and immunomodulating properties	45
I.4. α_2-MACROGLOBULINE	57
I.4.1. Muis α -macroglobulines	57
<i>I.4.1.1. α_2-Macroglobuline</i>	57

<i>I.4.1.2. Murinoglobuline</i>	58
I.4.2. Werkingsmechanisme van de α -macroglobulines met protease-inhiberende activiteit	58
I.4.3. De α_2 -macroglobuline receptoren	59
<i>I.4.3.1. De α_2-macroglobuline receptor</i>	60
<i>I.4.3.2. De α_2-macroglobuline signalisatie receptor</i>	60
I.4.4. Ligand binding en receptor gemedieerde endocytose	60
I.4.5. Biologische eigenschappen van α_2 -macroglobuline	61
<i>I.4.5.1. α_2-Macroglobuline als breed-spectrum protease inhibitor</i>	61
<i>I.4.5.2. α_2-Macroglobuline bindt cytokines en groeifactoren</i>	61
<i>I.4.5.3. Immunomodulerende functie van α_2M</i>	62
<i>I.4.5.4. Anti apoptotische eigenschappen van α_2M</i>	62
<i>I.4.5.5. In vivo beschermende eigenschappen</i>	62
I.4.6. α_2 -Macroglobuline is genetisch geassocieerd met de ziekte van Alzheimer	62
I.4.7. Fenotype van α_2 -macroglobuline (en murinoglobuline) -deficiënte muizen	63
I.5. BEKNOPTE BESCHRIJVING VAN DE GEBRUIKTE MUIS MODELLEN	64
I.5.1. Niet specifieke resistentie tegen infectie	64
I.5.2. Inflammatoir darmlijden	65
I.5.3. TNF- en LPS-gemedieerde letale shock	67
HOOFDSTUK II - ONDERZOEK NAAR DE ROL VAN α_1-ZUUR GLYCOPROTEINE	
IN NIET SPECIFIEKE RESISTENTIE TEGEN INFECTIE	69
II.1. INLEIDING	69
II.2. RESULTATEN: 'INVOLVEMENT OF THE ACUTE PHASE PROTEIN α_1-ACID GLYCOPROTEIN	
IN NONSPECIFIC RESISTANCE TO A LETHAL GRAM-NEGATIVE INFECTION'	70
II.3. BETROKKENHEID VAN ANDERE ACUTE FASE EIWITTEN IN NSRI	78
II.4. BESPREKING	79
HOOFDSTUK III – TRANSGENE OVEREXPRESSION VAN α_1-ZUUR GLYCOPROTEINE	
LEIDT TOT SENSITIZERING VOOR DE ONTWIKKELING VAN ACUTE COLITIS	83
III.1. INLEIDING	83
III.2. RESULTATEN: 'OVEREXPRESSION OF α_1-ACID GLYCOPROTEIN IN	
TRANSGENIC MICE LEADS TO SENSITIZATION TO ACUTE COLITIS'	84
III.3. BESPREKING	98

HOOFDSTUK IV – ONDERZOEK NAAR DE BETROKKENHEID VAN α_2-MACROGLOBULINE TIJDENS TUMOR NECROSIS FACTOR, GRAM-NEGATIEVE EN LIPOPOLYSACCHARIDE GEMEDIEERDE SHOCK	102
IV.1. INLEIDING	102
IV.2. RESULTATEN	103
IV.2.1. 'Differential response of α_2 -macroglobulin-deficient mice in models of lethal TNF-induced inflammation'	103
IV.2.2. 'Mice lacking α_2 -macroglobulin show increased host defence against Gram-negatieve bacterial sepsis, but are more susceptible to endotoxic shock'	109
IV.3. BESPREKING	118
HOOFDSTUK V – EERSTE FASE VAN DE ONTWIKKELING VAN α_1-ZUUR GLYCOPROTEINE-DEFICIENTE MUIZEN	121
V.1. INLEIDING	121
V.1.1. Embryonale stamcellen	121
V.1.2. Targeting construct	121
V.1.2.1. <i>Types targeting vectoren</i>	122
V.1.2.2. <i>Selectiemerkers</i>	122
V.1.2.3. <i>Homologe sekwenties</i>	123
V.1.3. Cre-LoxP systeem	123
V.1.4. Een nieuwe methode voor de constructie van een targeting vector: ET-klonering	124
V.2. RESULTATEN	125
V.2.1. Kloneren en karakteriseren van de muis agp genen	125
V.2.1.1. <i>Screenen van een genomische bank</i>	125
V.2.1.2. <i>Initiële karakterisatie van de positieve faakloons</i>	125
V.2.1.3. <i>Gedetailleerde karakterisatie van een aantal faagkloons</i>	126
V.2.2. Constructie van de targeting vector	128
V.2.3. Opstellen van een screening strategie	129
V.2.3.1. <i>Screening via PCR</i>	129
V.2.3.2. <i>Screening via southern blot</i>	131
V.2.4. Eigenlijke screening van de ES-cellen	131
V.2.5. Resultaat van de ES cel screening	132
V.2.6. Bespreking	133
REFERENTIES	136
LIJST MET PUBLICATIES	157

LIJST MET AFKORTINGEN

A β	amyloïd β
ActD	actinomycineD
ACTH	adrenocorticotroop hormoon
ADCC	antilichaam afhankelijke cel cytotoxiciteit
ADP	adenosine difosfaat
AFP	acute fase proteïne
AFR	acute fase reactie
amp ^r	ampicilline resistentie
AP-1	activerend proteïne-1
APRE	acute fase responsief element
ARDS	acuut respiratoir distress syndroom
AT-III	antitrombine-III
Bcr-Abl	breekpunt cluster regio-Abelson
BLMVEC	runder long microvasculaire endotheelcel
BSA	runder serum albumine
C/EBP	CCAAT/enhancer bindend proteïne
cAMP	cyclisch adenosine monofosfaat
CCR5	CC-chemokine receptor 5
CFU	kolonie vormende eenheden
cNOS	cyclisch NO-synthase
CNTF	ciliaire neurotrofe factor
ConA	concanavalineA
Cre	'Creates recombination'
CRP	C-reactief proteïne
DIC	algemene intravasculaire coagulatie
DL	detectielimiet
DRE	distaal regulatorisch element
DSS	dextraan natrium sulfaat
ECM	extracellulaire matrix
EGF	endotheliale groeifactor
ELAM-1	endotheliaal/leukocyt adhesie molecule-1
EPO	erytropoëetine
ES-cel	embryonale stamcel
ET-klonering	recombinaseE-recombinaseT klonering

FCS	foetaal kalf serum
FGF	fibroblast groeifactor
fMLP	formyl-methionyl-leucyl-fenylalanine
Fuc	fucose
FUT	fucosyltransferase
Gal	galactose
GalN	galactosamine
GalNAc	N-acetyl galactosamine
GCH	glucocorticoïd hormoon
G-CSF	granulocyt-kolonie stimulerende factor
GHRE	groeihormoon responsief element
GlcNAc	N-acetyl glucosamine
GlcNAcT	N-acetyl glucosamine transferase
GM-CSF	granulocyt monocyt-kolonie stimulerende factor
GRE	glucocorticoïd responsief element
HIV	humaan immunodeficiëntie virus
HO	heem-oxygenase
Hp	haptoglobine
hprt	hypoxantine fosforibosyltransferase
HSE	hitte shock element
HSP	hitte shock proteïne
HSVtk	herpes simplex virus thymidine kinase
I/R	ischemie/reperfusie
IBD	inflammatoir darmlijden
ICAM-1	intercellulair adhesiemolecule-1
IFN	interferon
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
IL-1Ra	interleukine-1 receptor antagonist
iNOS	induceerbaar NO-synthase
IP ₃	inositol trifosfaat
KH	korte homologie
LAP	lever-aangerijkt transcriptioneel activerend proteïne
LD	letale dosis
LFA-1	lymfocyt functie geassocieerd antigen-1
LH	lange homologie

LIF	leukemie inhiberende factor
Lox	'Locus of X-ing'
LPS	lipopolysaccharide
LRP	laag densiteits lipoproteïne receptor verwant proteïne
LT	leukotriene
LTB ₄	leukotriene B ₄
MAC	membraan aanvallend complex
MAC-1	macrofaag antigen-1
MAM	muis α_2 -macroglobuline
Man	mannose
MBP	mannaan bindend proteïne
MCP	monocyt chemoattractans proteïne
MIP	macrofaag inflammatoir proteïne
MLR	gemengde lymfocyt reactie
MnSOD	mangaan superoxide dismutase
MOF	multi-orgaan falen
MPO	myeloperoxidase
MT	metallothionine
MTT	3- (4,5- dimethyl thiol-2-Y) - 2, 5 difenyl tetrazolium bromide
MUG	murinoglobuline
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide waterstoffosfaat
NE	neutrofiel elastase
Neo ^r	neomycine fosfotransferase resistentie
NeuAc	neuraminezuur (sialzuur)
NF	nucleaire factor
NFKB	nucleaire factor KB
NGF	zenuw groeifactor
NK-cel	'natural killer'-cel
NO	stikstof oxide
Nopp140	nucleolair fosfoproteïne van 140 kDa
nsAGP	niet gesialyleerd AGP
NSRI	niet specifieke resistentie tegen infectie
ORM	orosomucoïd
OSM	oncostatine M
OZ	geopsoniseerd zymozan

PAF	plaatjes activerende factor
PB	fenobarbital
PBS	fosfaat gebufferde zoutoplossing
PBM	periferale bloed monocyten
PBRE	fenobarbital responsief element
PDGF	plaatjes gederiveerde groeifactor
PEP	fosfo-enol pyruvaat
PG	prostaglandine
PGE ₂	prostaglandine E ₂
PGI ₂	prostaglandine I ₂
pl	isoëlectrisch punt
PKC	proteïne kinase C
PLC	fosfolipase C
PMA	forbol myristaat acetaat
PMN	polymorfonucleair
PTK	proteïne tyrosine kinase
PWM	'pokeweed' mitogeen
RA	rheumatoïde arthritis
RAG	recombinatie activerend gen
RBP	retinol bindend proteïne
RE	responsief element
ROS	reactieve zuursof deeltjes
SAA	serum amyloïd A
sAGP	gesialyleerd AGP
SAP	serum amyloïd P
SD	standaard deviatie
sGC	oplosbaar guanylaat cyclase
SIRS	systemisch inflammatoir respons syndroom
(s)Le ^x	(sialyl)Lewis ^x
SOCS	suppressor van cytokine signalisatie
SPF	specifiek pathogeen vrij
SRU	steroïd responsief element
sTNFR	oplosbare tumor necrosis factor receptor
T ₃	triiodothyronine
TACE	TNF α converterend enzyme
TF	weefselfactor

TGF	transformerende groeifactor
TIF1 β	transcriptie intermediaire factor-1 β
TIMP-1	weefsel inhibitor van metallo protease-1
TNF	tumor necrosis factor
TRE	tyroïd hormoon responsief element
TXA ₂	tromboxaan A ₂
UDPG	uridine difosfaat glucose
URE	stroomopwaarts gelegen responsief element
VEGF	vasculaire endotheliale groeifactor
wt	wild type
YY1	Yin Yang 1
(α_1 -)AGP	α_1 -zuur glycoproteïne
α_1 -ACT	α_1 -antichymotrypsine
α_1 -AT (= α_1 -PI)	α_1 -antitrypsine (= α_1 -proteïnase inhibitor)
α_2 M	α_2 -macroglobuline
α_2 M*	geactiveerd α_2 -macroglobuline
α_2 MR	α_2 -macroglobuline receptor
α_2 MSR	α_2 -macroglobuline signalisatiereceptor

SITUERING EN SAMENVATTING VAN HET ONDERZOEK

Biologische afweersystemen worden traditioneel onderverdeeld in twee belangrijke klassen: aangeboren of natuurlijke immuniteit en verworven immuniteit. Verworven immuniteit (de naam zegt het zelf) doet beroep op 'ervaring' en heeft dus een bepaalde incubatietijd nodig vooraleer kan ingegrepen worden. De respons is dan wel heel specifiek en efficiënt. Aangeboren immuniteit is aspecifiek in zijn werking, maar treedt heel vlug op als eerstelijns verdediging. Het is een sterk geconserveerd beschermingsmechanisme dat in alle multicellulaire organismen teruggevonden wordt.

Een van de kenmerken van de aangeboren immuun respons is de ontwikkeling van een lokale inflammatie of ontstekingsreactie.

Inflammatie dient om een eventueel infectieus organisme te vernietigen en de verspreiding ervan tegen te gaan en om beschadigd weefsel af te breken en het afval (weefselresten, dode cellen en bacteriën) te verwijderen. Weefsel macrofagen liggen aan de basis van de inflammatoire respons. Ze stellen een aantal 'alarm' cytokines vrij die op hun beurt naburige cellen zullen activeren tot de productie van een tweede golf aan cytokines en chemokines. Het is deze tweede golf aan cytokines die voor een aantal responsen zorgt, waardoor de infectie en de weefselschade kunnen bestreden worden. Zo wordt het endotheel meer doorlaatbaar voor cellen en vloeistof (het zogenaamde exudaat, dat de 'ingrediënten' bevat om de infectie te bestrijden) uit de circulatie; schade aan het endotheel wordt afgedicht door recruitering van bloedplaatjes en het in gang zetten van de stollingscascade,...

De lokale inflammatoire reactie induceert dus ook een aantal systemische veranderingen om de infectie te bestrijden. Deze systemische veranderingen worden de acute fase respons (AFR) genoemd. De bedoeling bestaat er dus ook in om eventuele pathogenen te isoleren en te neutraliseren en verdere invasie van het pathogeen te verhinderen, terwijl ook de weefselschade beperkt wordt en herstelprocessen gestimuleerd worden, waardoor het organisme rapper zijn homeostatisch evenwicht terug kan bekomen.

Acute fase veranderingen kunnen ingedeeld worden in wijzigingen in plasma concentratie van een aantal eiwitten, de zogenaamde acute fase proteïnen (AFP's), en een groot aantal fysiologische, biochemische, nutritionele en gedragsveranderingen.

AFP's worden vooral door de lever aangemaakt. Tijdens een acute fase respons verandert de serumconcentratie ervan met tenminste 25%. Er zijn zowel AFP's die stijgen (positief AFP) als dalen (negatief AFP) in concentratie. Vooral IL-1 en IL-6 type cytokines en glucocorticoïden (die aangemaakt worden als gevolg van de inflammatoire respons) zijn verantwoordelijk voor de inductie van deze eiwitten. Naast deze kwantitatieve verandering, kunnen er ook kwalitatieve veranderingen optreden, meer bepaald in de glycaanstructuren. De veranderingen in glycosylatiepatroon worden weliswaar door dezelfde cytokines

gereguleerd die ook instaan voor de verhoogde productie van AFP's, maar beide processen verlopen onafhankelijk van elkaar.

Er wordt algemeen aangenomen dat de inductie van AFP's een positief effect oplevert voor het organisme. Dit wordt afgeleid uit de reeds gekende functionele eigenschappen van een aantal acute fase eiwitten en uit logische speculatie hoe deze eigenschappen tot nut kunnen zijn tijdens inflammatie, genezing, of aanpassing aan een schadelijke stimulus. De gekende biologische functies van AFP's kunnen ingedeeld worden in 3 grote categorieën: verdediging en aanpassing van de gastheer (bv. C-reactief proteïne, mannaan bindend proteïne), inhibitie van serine proteasen (bv. α_1 -proteïnase inhibitor, α_1 -antichymotrypsine) en transporteiwitten met antioxidans activiteit (bv. ceruloplasmine, haptoglobine). Van een aantal acute fase eiwitten (bv. serum amyloid A (SAA), α_1 -zuur glycoproteïne (AGP), α_2 -macroglobuline, (α_2 M)) is de eigenlijke biologische functie echter nog niet gekend.

AGP is een zwaar geglycosyleerd (45% van het moleculair gewicht bestaat uit suikerketens), zuur (pI = 2.7) acute fase proteïne, waarvan de concentratie tijdens een AFR 2-100 maal stijgt, afhankelijk van de diersoort (het komt voor bij alle tot op heden onderzochte zoogdieren). Er kunnen ook één of meerdere agp genen voorkomen, afhankelijk van de diersoort. De agp genen liggen wel allemaal in een cluster, en het expressieniveau ten opzichte van elkaar kan sterk verschillen. Het zijn hoofdzakelijk hepatocyten die AGP expresseren, maar extrahepatische expressie komt ook voor. De glycaanstructuren zijn tijdens een inflammatoire toestand eveneens onderhevig aan veranderingen. Zo kan het aantal zijtakken wijzigen (bi-, tri- of tetra-antennair, dit wordt grote microheterogeniteit genoemd) of kunnen er wijzigingen optreden in de graad van fucosylatie en sialylatie (wat kleine microheterogeniteit genoemd wordt). Deze wijzigingen in glycaanstructuren kunnen specifiek zijn voor een bepaald ziektebeeld. Omwille daarvan, en ook omwille van de concentratieverandering in het serum wordt AGP dikwijls gebruikt als merker of diagnosemiddel voor (de ernst van) een bepaalde aandoening.

Alhoewel de eigenlijke biologische functie van AGP niet gekend is, zijn in de literatuur toch al een aantal interessante immunomodulerende en inflammatoire eigenschappen van AGP beschreven, zowel *in vitro* als *in vivo*. Daarnaast kan AGP ook heel wat endo- en exogene drugs binden.

α_2 M is nog een ander acute fase eiwit (echter niet bij de mens) waarvan de eigenlijke biologische functie nog niet gekend is. Het behoort tot de familie van de thiolester-bevattende eiwitten (waartoe ook de complement eiwitten behoren). Het bezit een breed spectrum antiprotease activiteit, maar kan ook een aantal mitogenen, ionen, cytokines en groeifactoren binden. Na binding van een protease wordt dit sterisch geïnactiveerd door een conformatieverandering van het α_2 M, waarbij een receptor herkenningsplaats vrijkomt en het

α_2 M-protease complex uit de circulatie verwijderd wordt. Cytokines die door α_2 M gebonden worden, worden meestal niet geïnactiveerd door de binding, maar de biobeschikbaarheid ervan kan er wel door wijzigen. Ook voor α_2 M werden een aantal interessante immunomodulerende en beschermende eigenschappen beschreven in de literatuur.

Dit onderzoeksproject kadert in een groter geheel, waarin gezocht wordt naar lichaamseigen eiwitten met een uitgesproken anti-inflammatoire eigenschap. Een van deze eiwitten die in de onderzoeksgroep geïdentificeerd werd, op basis van zijn beschermende activiteit in het TNF en het TNF/GalN model is AGP. Aangezien AGP een acute fase proteïne is in alle tot op heden onderzochte zoogdieren, en aangezien de acute fase reactie een sterk geconserveerd initieel verdedigingsmechanisme is, was het de bedoeling om iets meer te weten te komen van de functie van AGP, voornamelijk tijdens acute fase omstandigheden.

Naast AGP werd, weliswaar in veel mindere mate, ook aandacht geschonken aan een ander acute fase proteïne, namelijk α_2 M. Dit eiwit bezit weliswaar een breed spectrum antiprotease activiteit maar er is nooit veel aandacht geschonken aan het nagaan van de specifieke functie van dit eiwit tijdens bepaalde inflammatoire omstandigheden.

Er werd ernaar gestreefd om de functie van deze acute fase eiwitten te testen in modellen van inflammatie die relevant zijn voor ziekteprocessen bij de mens. Op deze manier kon ook het eventueel therapeutisch nut van beide eiwitten beter geëvalueerd worden. Om een zo ruim mogelijk beeld te krijgen van de functie van deze eiwitten tijdens inflammatie, werden zowel modellen van lokale als van algemene inflammatie (injectie van Gram-negatieve bacteriën, TNF of LPS resulteren in een systemisch inflammatoir respons syndroom, shock, orgaanfalen en uiteindelijk letaliteit) gebruikt. Als model van lokale inflammatie werd gebruik gemaakt van dextraan natrium sulfaat (DSS) geïnduceerd acuut inflammatoir darmlijden.

Tenslotte lag het ook in de bedoeling om AGP-deficiënte muizen te maken. Die zouden dan eveneens kunnen ingeschakeld worden in het onderzoek naar een biologisch/pathofysiologisch relevante functie voor AGP.

In hoofdstuk II werd de rol van AGP onderzocht in 'niet specifieke resistentie tegen infectie' (NSRI), door gebruik te maken van een letale injectie met de Gram-negatieve bacteriën *K. pneumoniae* (een stam die vaak geïsoleerd wordt bij patiënten met sepsis). NSRI maakt deel uit van ons aangeboren immuunsysteem en kan gestimuleerd worden door toediening van agentia, die gelijkenissen vertonen met structuren van de celwand van Gram-negatieve bacteriën. Inzicht in het mechanisme van NSRI zou eventueel kunnen leiden tot alternatieve behandelingen tegen sepsis, dat wereldwijd 100.000en slachtoffers maakt op jaarbasis, vooral in ziekenhuizen. Er werd aangetoond dat NSRI kon opgewekt worden met terpentijn en IL-1, beide sterke induceerders van een acute fase respons. Aangezien in de literatuur

aanwijzingen waren dat acute fase proteïnen een rol konden spelen in NSRI, werd nagegaan of AGP bescherming kon bieden tegen de Gram-negatieve infectie. Dit was inderdaad het geval; zowel exogeen toegediend AGP als constitutief hoge endogene AGP niveaus (bij AGP transgene muizen), beschermden tegen een letale infectie met *K. pneumoniae*. De bescherming door terpentijn en IL-1 wordt waarschijnlijk gemedieerd via inductie van AGP, aangezien piek inductie van AGP overeen bleek te stemmen met de tijd die nodig is, na injectie van IL-1 of terpentijn respectievelijk, om een optimale bescherming te bekomen tegen de bacteriële infectie. Na voorbehandeling met terpentijn, IL-1 of AGP (maar ook in de AGP transgene muizen) waren significant minder bacteriën in de organen en het bloed te vinden in vergelijking met controle muizen. De bescherming door AGP was echter niet te wijten aan een rechtstreeks cytotoxisch effect op de bacteriën. AGP zou via interactie met het LPS van de bacteriën echter wel een stimulerend effect kunnen hebben voor de opruiming van de bacteriën, door de fagocytose ervan te bevorderen. Anderzijds zou AGP ook kunnen verhinderen dat de bacteriën zich via de circulatie naar de organen verspreiden, via zijn effect op de permeabiliteit van het endotheel, of, indien de bacteriën dan toch de circulatie binnengedrongen zijn, kan AGP via ditzelfde mechanisme ervoor zorgen dat de doorbloeding van de organen een voldoende lange tijd gevrijwaard blijft, terwijl de infectie bestreden wordt.

In hoofdstuk III werd de rol van AGP nagegaan tijdens acuut inflammatoir darmlijden (IBD) (een model voor lokale inflammatie). IBD is een verzamelnaam voor een aantal gastroïntestinale aandoeningen, waarvan de ziekte van Crohn en ulceratieve colitis de voornaamste zijn en vooral jonge mensen treffen (15-30j). De oorzaak van de ziekte is niet gekend, maar het staat vast dat zowel genetische als omgevingsfactoren een belangrijke rol spelen. Naast de chronische vorm van colitis, is er ook een acute vorm te onderscheiden. Deze treedt bij de mens vooral op na infectie met pathogenen, na intoxicatie met eroderende chemicaliën en in nog een aantal andere gevallen van ongekende oorsprong. Acute colitis treedt ook op bij zogenaamde 'relaps', het terug actief worden van de ziekte na een periode van relatieve rust. Door verschillende onderzoeksgroepen werd er een rechtstreeks verband gevonden tussen een hoge serumconcentratie AGP en een verhoogde kans op het optreden van een relaps. Om na te gaan wat het effect is van hoge serumconcentraties AGP op het optreden van een relaps, werd via toediening van DSS in het drinkwater een acute colitis opgewekt in AGP transgene muizen, die continu hoge concentraties AGP in het serum produceren.

De transgene muizen bleken veel gevoeliger aan de ontwikkeling van acute colitis dan wild type muizen. Dit bleek uit klinisch waarneembare parameters als het sneller optreden van gewichtsverlies, rectale bloeding en letaliteit. Dit bleek ook wanneer gekeken werd naar lokale inflammatoire parameters, zoals een sterkere aanwezigheid van geactiveerde

neutrofielen of een hogere inflammatoire score van darmcoupes. De systemisch inflammatoire parameters (IL-6 en SAP-concentratie in het serum) waren eveneens significant hoger in de transgene muizen in vergelijking met de wild type controles. Tenslotte waren er ook meer bacteriën aanwezig in de organen van de transgene muizen. Bovendien was een dosis effect waar te nemen van het AGP wanneer gekeken werd naar de lokale inflammatoire parameters, in die zin dat homozygoot transgene muizen nog gevoeliger waren voor de ontwikkeling van acute colitis dan heterozygoot transgene muizen.

Het mechanisme van DSS-geïnduceerde colitis is nog niet opgehelderd, maar er werd aangetoond dat DSS cytotoxisch is voor de epitheelcellen van het colon en dat macrofagen DSS kunnen fagocyteren en daardoor geactiveerd worden. Dit zou in belangrijke mate kunnen bijdragen tot de weefselschade, aangezien AGP macrofagen kan stimuleren tot de vrijstelling van pro-inflammatoire cytokines, waardoor er een positieve terugkoppeling kan ontstaan waarbij steeds meer macrofagen en andere cellen, zoals neutrofielen, geactiveerd worden en bijdragen tot de weefselschade. Deze weefselschade kan ertoe leiden dat bacteriën vanuit het lumen naar de organen lekken en daar voor complicaties zorgen.

Hoofdstuk IV handelt over de rol van α_2M tijdens Gram-negatieve, LPS-, en TNF-geïnduceerde shock. Hiervoor werd gebruik gemaakt van α_2M -deficiënte muizen ($MAM^{-/-}$). Alhoewel in de onderzoeksgroep aanwijzingen gevonden werden voor de betrokkenheid van serine proteasen in TNF-geïnduceerde toxiciteit, bleken $MAM^{-/-}$ muizen minder gevoelig aan TNF-geïnduceerde shock dan controle muizen. De bescherming was niet te wijten aan een verschil in bioactiviteit van het TNF in het serum van de muizen. Een mogelijke verklaring is de binding van α_2M op door TNF geïnduceerde inflammatoire mediators, waardoor deze al dan niet geïnhibeed worden of waardoor de biobeschikbaarheid ervan gewijzigd wordt.

α_2M -deficiëntie leidt ook tot bescherming tegen een letale dosis Gram-negatieve bacteriën. Het effect van α_2M blijkt zich, net zoals bij AGP, te situeren ter hoogte van de opruiming of verspreiding van de bacteriën. De afwezigheid van α_2M kan leiden tot een efficiëntere activatie en recrutering van neutrofielen (aangezien α_2M de activiteit van neutrofielen kan inhiberen). Het effect kan zich ook situeren ter hoogte van de vrijstelling van plaatjes activerende factor (PAF). Binding van α_2M op zijn signalisatiereceptor leidt tot de vrijstelling van PAF, dat een sterke vasodilaterende werking bezit en daardoor de verspreiding van de bacteriën via de circulatie in de hand kan werken. α_2M is ook in staat om neutrofiel elastase (NE) te binden en te inactiveren. NE speelt een belangrijke rol tijdens de verdediging tegen een Gram-negatieve infectie en is zelfs rechtstreeks cytotoxisch voor *K. pneumoniae*. Tenslotte kan α_2M via binding van andere inflammatoire mediators de activiteit of de biobeschikbaarheid ervan beïnvloeden.

De afwezigheid van α_2M oefent daarentegen een negatief effect uit tijdens endotoxine-geïnduceerde shock. Door anderen werd aangetoond dat α_2M kon beschermen tegen LPS-

geïnduceerde letaliteit, waarschijnlijk via binding van α_2M op PGE_2 , een sterk vasodilaterend agens, waardoor dit sneller uit de circulatie verwijderd werd. Dit zou een positief effect kunnen hebben op de vasculaire permeabiliteit. Een andere verklaring kan zijn dat α_2M het LPS bindt en sneller uit de circulatie verwijdert.

In hoofdstuk V tenslotte wordt de eerste fase beschreven van het genereren van AGP deficiënte muizen. Daartoe werden faagkloons die één of meerdere agp genen bezaten uit een genomische faagbank opgepikt en gekarakteriseerd. Aan de hand van deze faagkloons werd een gedetailleerde map opgesteld van de volledige agp locus. Hierbij bleek dat de drie agp genen zich in een locus van slechts 15 kb bevonden. Aan de hand van de bekomen restrictiemap werd een targeting vector gemaakt om de volledige agp locus mee te verwijderen en werd op hetzelfde moment een procedure uitgewerkt voor de screening van correct getargette ES-cel kloons, zowel via PCR als via southern blot. Na electroporatie van het gelineariseerde targeting construct in ES-cellen en na de selectieprocedure, werden 468 van de overlevende ES-cel kloons gescreend op het al dan niet bezitten van de correcte mutatie. Dit bleek bij geen enkele van deze kloons echter het geval te zijn. Deze lage efficiëntie kan verschillende oorzaken hebben. De lengte van de uit te voeren deletie kan een rol spelen, hoewel er al grotere deleties beschreven zijn, gebruik makend van een klassieke targeting vector. De negatieve selectiemerker kan beschadigd geweest zijn door de electroporatie of na introductie van het DNA in de ES-cellen omdat deze zich helemaal aan de rand van de gelineariseerde vector bevond (en dus gevoelig aan de werking van exonucleasen). Er kan tenslotte ook een probleem geweest zijn met de isogeniciteit van het DNA in de homologe regio van de targeting vector en van de ES-cellen. Dit omwille van het feit dat de R1 ES-cellijn die gebruikt werd contaminerend DNA bevat, ondermeer in de regio van de agp locus.

Met dit onderzoek hebben we aangetoond dat acute fase eiwitten niet noodzakelijk een beschermende functie uitoefenen tijdens een inflammatoire respons en dat het effect van een AFP sterk afhankelijk is van het inflammatoir model waarin het getest wordt.

HOOFDSTUK I - INLEIDING

I.1. INFLAMMATIE

Inflammatie of ontsteking is de respons van gevasculariseerd levend weefsel op lokale schade. Acute inflammatie is van korte duur (maximaal enkele dagen). Indien de inflammatie langer aansleept (weken, maanden, continu), spreekt men van chronische inflammatie. Acute inflammatie kan veroorzaakt worden door een infectie, trauma (mechanisch, elektrisch, hitte of chemisch), ischemie (*anoxia*, *hypoxia*), immuun reacties (antigen/antilichaam complex), e.a.

De acute inflammatoire respons heeft 3 belangrijke functies:

1. Er wordt een exudaat gevormd in het beschadigd weefsel. Dit exudaat bestaat uit eiwitten, vocht en cellen uit naburige bloedvaten.
2. Vernietigen van een eventueel infectueus organisme (bv. bacterie) met behulp van het aanwezige exudaat.
3. Het beschadigde weefsel wordt afgebroken en het afval (weefselresten, dode cellen en bacteriën) wordt verwijderd.

I.1.1. Klinische aspecten van acute inflammatie

De 4 belangrijkste effecten van een acute inflammatie werden reeds 2000 jaar geleden beschreven door Celcus:

Rubor of roodheid: weefsel dat ontstoken is wordt rood (bv. huid na zonnebrand). Dit is te wijten aan het uitzetten (dilatatie) van kleine bloedvaatjes in het beschadigde weefsel.

Calor of warmte: verhoging in temperatuur gebeurt enkel op perifere plaatsen van het lichaam (bv. de huid). Dit is te wijten aan een verhoogde toevoer van bloed (*hyperaemia*) naar het beschadigd weefsel en het afleveren van warm bloed in de getroffen zone. Koorts, als gevolg van de inflammatie draagt ook bij tot de lokale temperatuursverhoging.

Tumor of zwelling: zwelling treedt op als gevolg van oedeem, de accumulatie van vloeistof in de extracellulaire ruimte.

Dolor of pijn: dit is voor een deel het gevolg van het uitzetten en de heroriëntatie van de weefsels als gevolg van het oedeem. Ook bepaalde mediators, waaronder bradykinine, prostaglandines en serotonine induceren een pijnrespons.

Functio laesa of verlies van functie: dit laatste werd aan het rijtje toegevoegd door Virchow (1821-1902). Beweging van een ontstoken weefsel wordt bewust en reflexmatig gehinderd door pijn, terwijl de zwelling het weefsel fysiek immobiliseert.

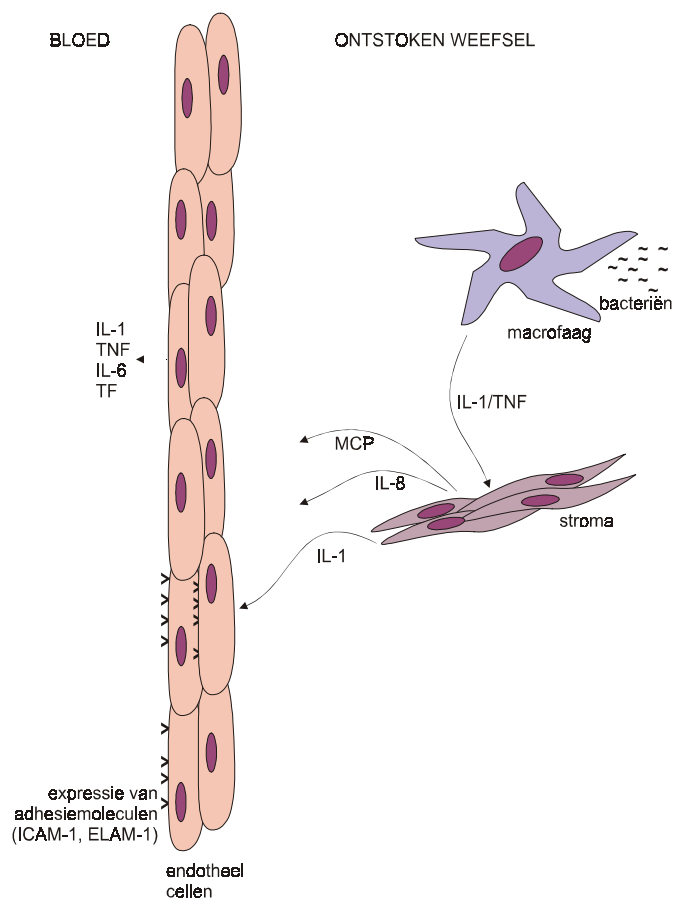
De 'ouden' associeerden de waarneembare warmte en roodheid met de hel, duivels en kwade geesten, die de mens kwelden voor bedreven zonden. Veel van deze oude opvattingen hebben lang standgehouden. In de loop van de negentiende eeuw ging men de

zaken echter wat nuchterder bekijken. Louis Pasteur ontdekte dat binnendringende microörganismen ontstekingen veroorzaken. Later vond Elie Metchnikoff, een Russisch bioloog die ook werkzaam was aan het Parijse Institut Pasteur, dat complexe levende wezens speciale cellen bezitten die over het merkwaardig vermogen beschikken zich te kunnen verplaatsen in de richting van een binnengedrongen microörganisme, de fagocyten, en dat deze fagocyten de microörganismen kunnen opnemen.

I.1.2. Overzicht van de inflammatoire respons

I.1.2.1. Initiatie van de inflammatoire respons

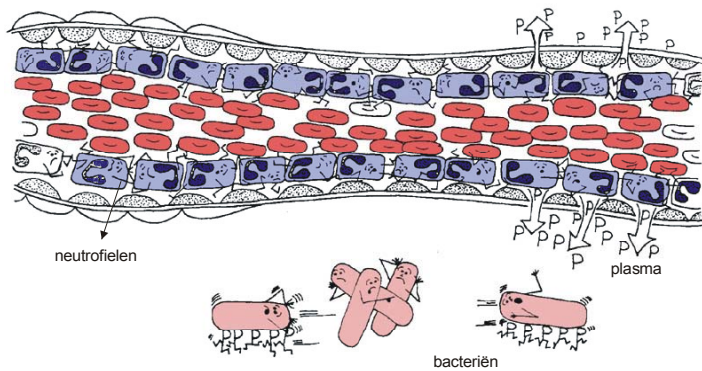
Weefsel macrofagen liggen aan de basis van de inflammatoire respons (Gauldie, 1991). Macrofagen worden door de inflammatoire stimulus (bv. infectie) geactiveerd en stellen een aantal primaire inflammatoire mediators vrij. De belangrijkste daarvan zijn interleukine-1 (IL-1) en tumor necrosis factor (TNF). Deze 'alarm' cytokines activeren op hun beurt naburige cellen uit het stroma (fibroblasten en endotheelcellen) en zorgen aldus voor de vrijstelling van een secundaire golf van cytokines en chemokines, waaronder IL-1, TNF, IL-6, IL-8 en monocyten chemoattractans proteïne (MCP) (figuur I.1) (Matsushima en Oppenheim, 1989). Deze lokale cytokine vrijstelling resulteert in een aantal responsen.



Figuur I.1: Initiatie van de inflammatoire respons. Een inflammatoire stimulus (in dit geval een bacteriële infectie) activeert de weefsel macrofagen, waardoor deze o.a. TNF en IL-1 vrijstellen. Deze 'alarm' cytokines activeren op hun beurt andere cellen uit het stroma, vnl. fibroblasten en endotheelcellen. Deze zullen een secundaire golf aan cytokines en chemokines vrijstellen, waaronder TNF, IL-1, IL-6, IL-8 en MCP. Deze cytokine vrijstelling zorgt voor de inductie van de volgende stappen tijdens inflammatie. Endotheelcellen zullen na activatie ook TF expresseren en adhesiemoleculen, zoals ICAM-1 en ELAM-1.

I.1.2.2. Leukocyt adhesie aan het endotheel

Op lokale endotheelcellen wordt de expressie van integrines en selectines (carbohydraat-bindende membraan eiwitten, waaronder ICAM-1) geïnduceerd. Deze spelen een cruciale rol in de communicatie tussen de plaats van inflammatie in het weefsel en de circulerende leukocyten in het bloed. IL-1 en TNF, vrijgesteld door endotheelcellen, zullen ook neutrofielen en monocytten in het bloed stimuleren om liganden (o.a. de β 2-integrines LFA-1 (CD11a/CD18) en MAC-1 (CD11b/CD18)) aan hun oppervlak te expresseren die de selectines op de endotheelcelwand kunnen binden. Daardoor wordt de recrutering van leukocyten uit het bloed bevorderd (figuur I.2) (Lasky, 1995; Cummings *et al.*, 1992; McEver, 1991).



Figuur I.2: Leukocyt adhesie aan het endotheel. De neutrofielen binden met hun liganden (o.a. LFA-1 en MAC-1) de receptoren op de endotheelcellen. Ondertussen sijpelt ook plasma (P) tussen de endotheelcellen naar het onderliggend weefsel, waar het zorgt voor een verdunning van de inflammatoire stimulus. Dit is mogelijk doordat de endotheelcellen minder dicht tegen elkaar aan komen te liggen (zie verder).

Er kan echter ook endotheelschade optreden als gevolg van het inflammatoir proces. Dit kan ondermeer een gevolg zijn van de 'alarm' cytokines; IL-1 en TNF zijn rechtstreeks cytotoxisch voor endotheelcellen. Neutrofiel adhesie kan de endotheelcellen echter ook schade toebrengen. Geactiveerde neutrofielen stellen namelijk elastase vrij, dat in de endotheelcellen binnendringt en deze kan beschadigen of zelfs afdoden (Lentsch en Ward, 2000). Beschadiging van de endotheelcellen door de 'alarm' cytokines of door neutrofiel adhesie zal eveneens bijdragen tot verhoogde permeabiliteit van de endotheelwand. Er is echter grote variatie tussen endotheelcellen afkomstig van verschillende vasculaire weefsels wat betreft de gevoeligheid tegenover neutrofiel-gemedieerde cytotoxiciteit (Murphy *et al.*, 1998).

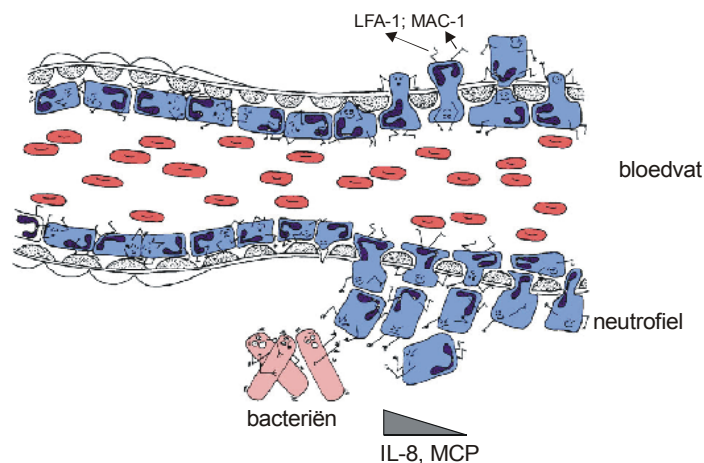
I.1.2.3. Fysisch afdichten van beschadigde bloedvaten

Onder invloed van IL-1 zullen de endotheelcellen ondermeer lokaal stollingsfactoren gaan produceren, zoals weefsel factor (TF). De meeste niet-vasculaire cellen expresseren TF aan hun membraanoppervlak; endotheelcellen doen dit niet. Onder normale omstandigheden komt het bloed dus niet in contact met TF. Na stimulatie van het endotheel echter (bv. na weefselschade), of wanneer het bloedvat zelf schade opgelopen heeft komt het bloed in contact met TF, waardoor er een complex gevormd wordt met factor VII. Dit complex

katalyseert de activatie van factor IX (tot IXa) en factor X (tot Xa). Op deze manier wordt de stollingscascade in gang gezet wat leidt tot de vorming van trombine en uiteindelijk tot de afzetting van fibrine dat samen met de bloedplaatjes een fysische afdichting vormt van het beschadigde bloedvat (McVey, 1994). De geaggregeerde bloedplaatjes zullen op hun beurt andere mediators, zoals histamine en serotonine vrijstellen. Deze veroorzaken het uitzetten van de bloedvatwand (dilatatie), zodat endotheelcellen minder dicht tegen elkaar gaan aanleunen en het bloedvat lek vertoont (Wu en Thiagarajan, 1996).

I.1.2.4. Extravasatie naar de beschadigde weefsels

Neutrofielen en monocytten die over het endotheeloppervlak rollen verliezen snelheid en worden daardoor nog steviger gebonden. Tengevolge van de dilatatie van het bloedvat zullen leukocyten en rode bloedcellen tussen de endotheelcellen door migreren naar de beschadigde weefsels. De gradiënt van chemotactische moleculen zal er voor zorgen dat de gerecruteerde leukocyten naar de plaats van de inflammatie migreren (figuur I.3).



Figuur I.3: Na binding van de neutrofielen aan het endotheel, en wegens de dilatatie van de bloedvatwand, zullen de neutrofielen tussen de endotheelcellen heen naar het onderliggend weefsel migreren, waar ze onder invloed van chemotactische moleculen (o.a. IL-8, MCP) zich in de richting van de inflammatoire stimulus bewegen.

Daar zullen ze op hun beurt pro-inflammatoire cytokines vrijstellen (Cassatella, 1995). De gerecruteerde leukocyten worden geactiveerd om een optimale antibacteriële activiteit uit te oefenen; dit impliceert een verhoogde expressie van bepaalde receptoren (zoals complementreceptoren), verhoogd celmetabolisme en verhoogde eiwit expressie. Zo ontstaat een cytokine cascade, waardoor de recrutering en activatie van immuun effector cellen snel opgereguleerd wordt om lokaal de eigenlijke inflammatoire stimulus en de daarmee gepaard gaande weefselschade te bestrijden (Baumann en Gaudie, 1994).

I.1.3. Overzicht van een aantal inflammatoire mediators

Aangezien het niet de bedoeling is om te diep in detail te treden betreffende alle mogelijke mediators die tijdens inflammatie een rol spelen, werden de belangrijkste, samen met hun functie, hieronder in tabelvorm weergegeven (tabel I.1).

FUNCTIE VAN CHEMISCHE MEDIATOREN TIJDENS ACUTE INFLAMMATIE	
Mediatoren door cellen vrijgesteld	Functie (producerende cellen)
vasoactieve amines	
<i>histamine, serotonine</i>	verhoogde capillaire permeabiliteit (basofielen, mastcellen, plaatjes)
NO	vasodilatatie; rechtstreekse cytotoxiciteit (macrofagen, endotheelcellen)
arachidonzuur-metabolieten	
<i>TXA₂</i>	plaatjes aggregatie en vasoconstrictie (plaatjes, neutrofielen, monocytten, macrofagen)
<i>PGI₂</i>	vasodilatatie en inhibitie van plaatjes aggregatie (voornamelijk endotheelcellen)
<i>LTB₄</i>	chemoattractans, neutrofiel adhesie aan het endotheel, degranulatie (neutrofielen, macrofagen, mastcellen, basofielen, Langerhans cellen, B-cellen)
<i>PAF</i>	plaatjes aggregatie; stimuleert vrijstelling histamine en serotonine; bronchoconstrictie; vasoconstrictie en-dilatatie (bij lage conc.); leukocyt chemotaxis; stimuleert PG en LT synthese (basofielen, neutrofielen, monocytten, endotheelcellen)
cytokines	
<i>IL-1 en TNF</i>	inductie adhesiemoleculen; induceert vrijstelling van cytokines, <i>PGI₂</i> en <i>PAF</i> ; verhoogt thrombogenese v/h endotheel; induceert systemische effecten van inflammatie (o.a. koorts); draagt bij tot hypotensie tijdens septische shock (monocytten, macrofagen, endotheelcellen, fibroblasten)
<i>IL-2</i>	promoot klonale expansie van door antigeen gestimuleerde CD8+ T-cellen; groeifactor voor CD4+ en NK-cellen (T-cellen)
<i>IL-4</i>	Th2-differentiatie, co-stimulator voor proliferatie van B-cellen, T-cellen en NK-cellen, Ig-klasse switching, vermindert inflammatoire functies van monocytten en macrofagen (T-cellen)
<i>IL-6</i>	induceert vrijstelling acute fase eiwitten in de lever; ACTH vrijstelling (macrofagen, fibroblasten, endotheelcellen)
<i>IL-8</i>	neutrofiel chemotaxis en activatie, stimuleert angiogenese (monocytten, granulocytten, fibroblasten, endotheelcellen, hepatocytten)
<i>IL-10</i>	inhibeert productie Th1 cytokines (T-cellen, B-cellen)
<i>IL-12</i>	activeert NK-cellen tot de productie van IFN γ ; groeifactor voor CD4+, CD8+ T-cellen en NK-cellen (dendritische cellen)
<i>IL-18</i>	synergistisch met IL-12; activatie NK-cellen, IFN γ productie door T-cellen, B-cellen, NK-cellen, productie GM-CSF in T-cellen (monocytten, macrofagen, dendritische cellen)
<i>MIP, MCP</i>	chemoattractantia voor monocytten, NK-cellen; histamine vrijstelling door basofielen
<i>IFNγ</i>	recrutering van macrofagen (fibroblasten, monocytten, endotheelcellen, plaatjes)
groeifactoren	
<i>TGFβ</i>	inductie MHC klasse II antigen expressie; activatie macrofagen; verhoogde expressie adhesiemoleculen door endotheelcellen (T-cellen, NK-cellen)
<i>PDGF</i>	inhibitie celgroei; onderdrukt activatie T-cellen en antilichaam productie B-cellen; controleert ECM-productie (bijna alle cellen kunnen gestimuleerd worden tot TGF β -secretie)
<i>VEGF</i>	chemotactisch voor fibroblasten, monocytten, neutrofielen en vasculaire gladde spiercellen; fibroblast mitogeen, stimuleert collageenproductie (bindweefselcellen, endotheelcellen, hematopoëtische cellen)
	induceert angiogenese, verhoogt vasculaire permeabiliteit (fibroblasten, epitheelcellen)
Plasma mediators	Functie
complement systeem	
<i>C3a</i>	verhoogt vasculaire permeabiliteit
<i>C5a</i>	chemotactisch voor neutrofielen, eosinofielen, basofielen en monocytten, verhoogt expressie leukocyt adhesie moleculen
<i>C3b</i>	opsonisatie; wordt herkend door receptoren op neutrofielen, macrofagen en eosinofielen
<i>C5-9</i>	membraan aanvullend complex (MAC), lyseert microorganismen
kinine systeem	stimulatie vloeistof extravasatie (zwellen), induceert vrijstelling cytokines, PG en LT
<i>bradykinine</i>	chemische mediator van de pijnreactie; vasodilatatie
coagulatie systeem	verantwoordelijk voor de vorming van fibrine
fibrinolytische systeem	verantwoordelijk voor de opruiming van fibrine

Tabel I.1: Overzicht van de belangrijkste chemische mediators en hun respectievelijke functie tijdens het inflammatie proces.

I.1.4. Inductie van acute fase eiwit synthese

Het IL-6 dat in de bloedbaan vrijgesteld wordt zal op een rechtstreekse en onrechtstreekse manier de productie van acute fase eiwitten in de lever induceren. Onrechtstreeks door in de hypothalamus het corticotroop vrijstellend hormoon te induceren, dat zelf inwerkt op de hypofyse en er de vrijstelling van adrenocorticotroop hormoon (ACTH) bevordert. Dit ACTH wordt via de bloedbaan vervoerd naar de bijnieren waar het finaal voor de verhoogde aanmaak van glucocorticoïd hormoon (GCH) instaat. Dit GCH is net als IL-6 een rechtstreekse induceerder van acute fase eiwit synthese in de lever en werkt er synergistisch met IL-1, TNF en IL-6 (Castell *et al.*, 1989; Kushner en Mackiewicz, 1993).

Naast cytokines, chemokines en glucocorticoïden spelen ook groeifactoren een belangrijke rol. Groeifactoren kunnen eveneens de expressie van acute fase eiwitten moduleren. Zo kan insuline de inductie van de meeste acute fase eiwitten door IL-1 en IL-6 gedeeltelijk inhiberen en bezit dus een regulatorische activiteit die tegengesteld is aan deze van glucocorticoïden (Campos *et al.*, 1992).

I.1.5. Lokale effecten van acute inflammatie

De lokale effecten van een acute inflammatie hebben een duidelijk positief karakter (bijvoorbeeld het vernietigen van microorganismen), maar in bepaalde gevallen kennen ze een schadelijke afloop.

I.1.5.1. Positieve effecten van acute inflammatie

Zowel het vocht als de cellen van het exudaat kunnen gunstige effecten uitoefenen. Deze van het vocht zijn de volgende:

- (i) verdunnen van toxines: bepaalde bacteriën produceren toxines; het aanwezige vocht verdunt deze en voert ze weg naar het lymfesysteem.
- (ii) aanvoer van antilichamen: door de verhoogde vasculaire permeabiliteit kunnen antilichamen de extravasculaire ruimte binnendringen en daar, samen met het complementsysteem en de aanwezige fagocyten zorgen voor lyse en fagocytose van microorganismen. Doelwitcellen die met antilichamen bedekt zijn worden gedood door gespecialiseerde cellen zoals NK-cellen, cytotoxische T-cellen of macrofagen, die Fc-receptoren dragen waarmee de antilichamen kunnen gebonden worden. Dit wordt antilichaam afhankelijke cel gemedieerde cytotoxiciteit genoemd (ADCC). Antilichamen kunnen ook belangrijk zijn in het neutraliseren van toxines.
- (iii) drug transport: in het vocht worden therapeutische drugs meegevoerd, zoals antibiotica, die op deze manier de plaats bereiken waar de bacteriën zich vermenigvuldigen.
- (iv) fibrine vorming: fibrine vormt zich uit het fibrinogeen dat zich in het exudaat bevindt. Het bemoeilijkt de verspreiding van microorganismen en immobiliseert ze in een netwerk van fibrinevezels, waardoor ze gemakkelijker gefagocyteerd kunnen worden.

(v) aanvoer van voedingsstoffen en zuurstof: dit is essentieel voor de aanwezige cellen, zoals neutrofielen, die een hoge metabolische activiteit vertonen tijdens het verdedigingsproces.

(vi) stimulatie van de immuun respons: het vocht van het exudaat wordt afgevoerd via de lymfekanalen, waarlangs vaste deeltjes en oplosbare antigenen in de lokale lymfeknopen B- en T-cellen activeren.

(vii) regulatie van cytokine bioactiviteit en beschikbaarheid: serine proteasen die door neutrofielen vrijgesteld worden zijn waarschijnlijk nauw betrokken zijn in het moduleren van de activiteiten van cytokines en hun receptoren (Bank en Ansorge, 2001).

De cellen van het exudaat zijn voornamelijk neutrofielen en monocyt/macrofagen.

(i) neutrofielen zijn de belangrijkste cellen tijdens acute inflammatie. Ze moeten constant aangevoerd worden, wegens hun korte levensduur. De meeste sterven ter plaatse af, terwijl een aantal via de lymfe afgevoerd wordt. Wanneer de weefselschade slechts gering is, worden ze aangevoerd uit het bloed. Bij ernstige weefselschade echter, worden neutrofielen, waarvan een deel nog in immature vorm, vrijgesteld uit het beenmerg. Om het aantal neutrofielen op peil te houden stimuleren groeifactoren (o.a. granulocyt-kolonie stimulerende factor (G-CSF), granulocyt/monocyt-kolonie stimulerende factor (GM-CSF)), opgewekt tijdens het inflammatoir proces, de deling van myeloïde precursoren in het beenmerg, waardoor het aantal neutrofielen dat zich uit deze precursoren ontwikkelt, stijgt.

(ii) bloed monocyt/macrofagen transformeren in macrofagen eenmaal ze uit de bloedbaan in het weefsel gemigreerd zijn. Daardoor worden ze metabolisch actiever, beweeglijker en fagocytotisch. Fagocytose van microorganismen wordt bevorderd door opsonisatie via antilichamen of complement. De fagocyterende activiteit van macrofagen tijdens acute inflammatie is meestal niet zo uitgesproken als deze van neutrofielen. Ze treden vooral later op tijdens de respons waar ze verantwoordelijk zijn voor het opruimen van beschadigde cellen en weefselafval.

Het afdoden of degraderen van pathogenen gebeurt via anaerobe en aerobe pathways. Anaeroob: zowel neutrofielen als macrofagen kunnen lysozomale enzymen vrijstellen in het extracellulair milieu, door middel van exocytose, die microorganismen en beschadigd weefsel degraderen.

Aeroob: zuurstof wordt gereduceerd tot superoxide ion d.m.v. NADPH oxidase; het superoxide ion wordt dan geconverteerd tot waterstofperoxide. Het myeloperoxidase van neutrofielen kan dit op zijn beurt omzetten tot hypochloorzuur, een sterk oxidans met antimicrobiële werking (Urban *et al.*, 1995).

I.1.5.2. Schadelijk effecten als gevolg van acute inflammatie

Aangezien veel componenten van de inflammatoire respons schade kunnen berokkenen aan de gastheer, moet inflammatie gezien worden als een soort van berekend risico. Hoewel het uiteindelijke doel van de inflammatie is om de gastheer te verdedigen, kan een ongecontroleerde inflammatoire respons de gastheer ernstige schade berokkenen:

(i) afbraak van gezond weefsel: enzymen als collagenasen of proteasen kunnen naast beschadigd weefsel ook het omringende gezond weefsel aantasten en vernietigen. Dit kan leiden tot vasculaire schade (Lentsch en Ward, 2000).

(ii) zwelling: zwelling is vooral schadelijk wanneer ze optreedt in een afgesloten ruimte, zoals bij cerebrale abscessen. Dit kan een zodanige druk veroorzaken, dat de bloedtoevoer verhinderd wordt, waardoor er ischemische schade optreedt. Wanneer er zwelling in de luchtwegen optreedt kan dit eveneens leiden tot verstikking (del Zoppo en Hallenbeck, 2000).

(iii) ongewenste inflammatoire respons: in bepaalde gevallen treedt een inflammatoire respons op tegen een omgevingsantigen (bv. pollen) die normaalgezien geen bedreiging vormen voor het individu. Dergelijke allergische respons kan levensbedreigend zijn (Davies *et al.*, 1999).

(iv) acute inflammatie kan ook resulteren in chronische inflammatie; reumatoïde arthritis is daar het prototype voorbeeld van (Persidis, 1999).

(v) systemisch inflammatoir respons syndroom (SIRS) is het gevolg van een overdreven immuunrespons, leidend tot een ongecontroleerde coagulatie en fibrinolyse (zie verder: I.5 Beknopte beschrijving van de gebruikte muis modellen).

I.1.6. Chronische inflammatie

De overgang van acute naar chronische inflammatie is moeilijk nauwkeurig te bepalen. Chronische inflammatie kan een gevolg zijn van een acute inflammatie, wanneer de originele stimulus blijft bestaan, maar kan ook optreden na herhaalde periodes van acute inflammatie, of kan *de novo* ontstaan wanneer de stimulus die aan de basis ligt slechts een milde respons opwekt. Een belangrijk kenmerk van chronische inflammatie is de cel gemedieerde immuun respons. Chronische inflammatoire lesies bevatten zelfs voornamelijk mononucleaire cellen, zoals macrofagen, lymfocyten en plasma cellen.

I.2. DE ACUTE FASE RESPONS

De vroegste waarneming van wat nu de acute fase respons genoemd wordt, dateert reeds van bij de oude Grieken (Fahracus, 1921). Zij hadden geobserveerd dat de erythrocyten sneller bezonken in het bloed van ernstig zieke patiënten. Nu weten we dat dit komt door de verhoogde plasma concentratie van fibrinogeen en andere acute fase eiwitten.

De term 'acute fase respons' in zijn huidige betekenis, werd geïntroduceerd in 1930. Toen men de systemische veranderingen begon te onderzoeken, die gepaard gaan met inflammatie, ontdekte men het C-reactief proteïne (CRP, zo genoemd omdat het bindt met het C-polysaccharide van pneumococcon) in het plasma van patiënten, tijdens de acute fase van longontsteking, veroorzaakt door pneumococcon (Tillet *et al.*, 1930). De systemische veranderingen die met deze infectie gepaard gingen, werden dan ook 'de acute fase respons' genoemd (Kushner, 1993). Deze naam is eerder misleidend, omdat achteraf bleek dat de acute fase respons ook kan optreden tijdens chronische inflammatie (Dinarello, 1984). De acute fase respons omvat de systemische reacties die plaatsvinden direct na een inflammatoire stimulus. De bedoeling bestaat erin om eventuele pathogenen te isoleren en te neutraliseren en verdere invasie van het pathogeen te verhinderen, terwijl ook de weefselschade beperkt wordt en herstelprocessen gestimuleerd worden, waardoor het organisme rapper zijn homeostatisch evenwicht terug kan bekomen.

Acute fase veranderingen kunnen ingedeeld worden in wijzigingen in plasma concentratie van een aantal eiwitten, de zogenaamde acute fase eiwitten (tabel I.2), en een groot aantal fysiologische, biochemische, nutritionele en gedragsveranderingen (figuur I.4). Een acute fase eiwit werd gedefinieerd als een plasma eiwit, waarvan de concentratie tijdens inflammatoire omstandigheden met tenminste 25 % stijgt (positief acute fase eiwit) of daalt (negatief acute fase eiwit) (Kushner en Mackiewicz, 1987). Dit is wel een empirische definitie, aangezien de term 'acute fase' eiwit gebaseerd is op een verandering in concentratie in het plasma, terwijl dergelijke concentratie verandering daarvoor niet noodzakelijk optreedt in andere lichaamscompartimenten (bv. het cerebrospinaal vocht), of in andere diersoorten (Schreiber, 1987). Er werden verschillende classificatiesystemen uitgewerkt om de acute fase eiwitten in onder te brengen. Zo werden de positieve acute fase eiwitten onderverdeeld in 3 groepen afhankelijk van de verandering in concentratie ervan: de concentratie van de AFP's in groep I stijgt tot 50 %; in groep II is de stijging 2 tot 5-voudig en in groep III kan de stijging tot 1000 x oplopen (Kushner, 1988). Een andere manier om de AFP's onder te verdelen is al naargelang de cytokines waardoor ze geïnduceerd worden: De AFP's die geïnduceerd worden door IL-6 en IL-1 (o.a. opsonines en transporteiwitten) en deze die enkel door IL-6 geïnduceerd worden (o.a. alle protease inhibitoren en fibrinogeen) (Richards *et al.*, 1991).

ACUTE FASE EIWITTEN BIJ DE MENS

POSITIEVE ACUTE FASE EIWITTEN

Complement systeem

C3

C4

C9

*Factor B**C1 inhibitor**C4b bindend eiwit**Mannaan bindend eiwit*

Coagulatie en Fibrinolytisch systeem

*Fibrinogeen**Plasminogeen**Weefsel plasminogeen activator**urokinase**proteïne S**Vitronectine**Plasminogeen activator inhibitor 1*

Antiproteases

 α_1 -protease inhibitor *α_1 -antichymotrypsine**pancreas secretorisch trypsine inhibitor**Inter- α -trypsine inhibitoren*

Transporteiwitten

*Ceruloplasmine**Haptoglobine**Hemopexine*

Mediatoren van de inflammatoire respons

*Gesecreteerd fosfolipase A2**Lipopolysaccharide bindend eiwit**Interleukine-1 receptor antagonist**Granulocyt kolonie-stimulerende factor*

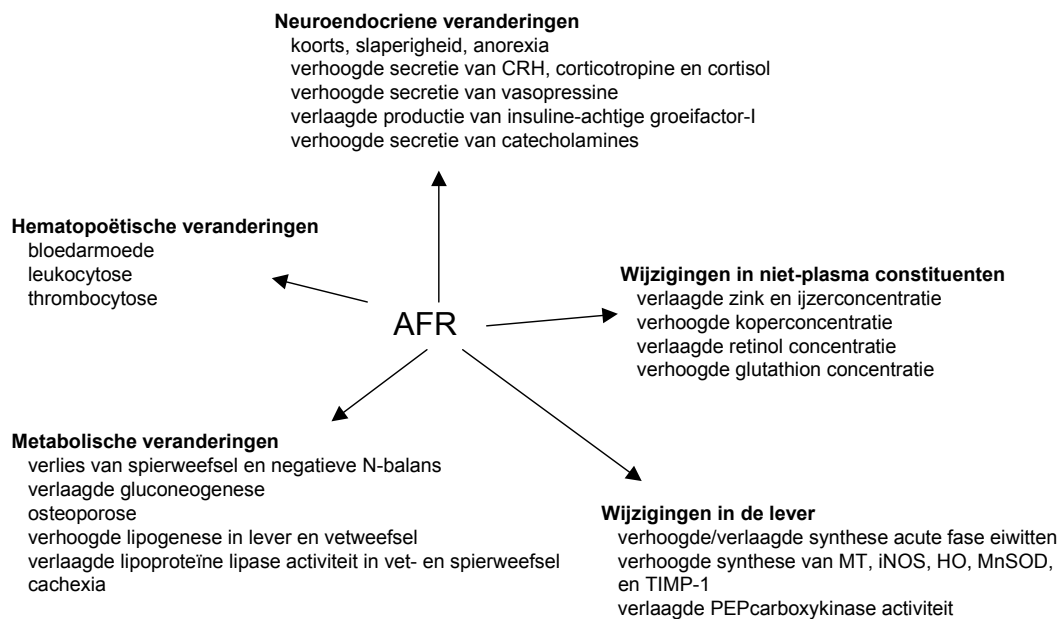
Andere

*C-reactief proteïne**serum amyloïd A* *α_1 -zuur glycoproteïne**Fibronectine**Ferritine**Angiotensinogeen*

NEGATIEVE ACUTE FASE EIWITTEN

*Albumine**Transferrine**Transthyretine* *α_2 -HS glycoproteïne* *α -fetoproteïne**Thyroxine bindend globuline**Insuline-achtige groeifactor I**Factor XII**Retinol bindend eiwit*
Tabel I.2: Acute fase eiwitten bij de mens (Gabay *et al.*, 1999)

De veranderingen in de concentratie van acute fase eiwitten zijn vooral te wijten aan veranderingen in de productie ervan door hepatocyten. Afhankelijk van het soort stimulus kan de concentratie van de acute fase eiwitten sterk, matig of zwak wijzigen. Sterke veranderingen treden op bij infectie, trauma, chirurgische ingreep, brandwonden, weefselschade en kanker (Kushner, 1982). Matige veranderingen zijn waar te nemen na zware inspanningen (Meyer *et al.*, 2001) en bij de geboorte van een kind (Marchini *et al.*, 2000), terwijl zwakke veranderingen optreden na psychologische stress en bij verscheidene psychiatrische aandoeningen (Maes *et al.*, 1997). De acute fase respons komt voor bij alle zoogdieren en zelfs bij lagere diersoorten, zoals krabben. Dit wijst op een evolutionair gezien belangrijk proces. Er zijn echter toch wel verschillen wat betreft de keuze van de eiwitten die als AFP's reageren al naargelang de diersoort. Zo reageert het belangrijkste acute fase eiwit bij de mens, CRP, nauwelijks als AFP in de muis, terwijl omgekeerd C3 zich wel bij de muis maar niet bij de mens als AFP gedraagt (Kushner en Mackiewicz, 1993).



Figuur I.4: Overzicht van de wijzigingen die optreden tijdens een acute fase respons (Gabay *et al.*, 1993)

I.2.1. Regulatie van de acute fase veranderingen

I.2.1.1. Inductie van acute fase eiwitten

De cytokines die tijdens een inflammatie geproduceerd worden zijn de belangrijkste induceerders van acute fase eiwitsynthese. Het zijn de IL-6 type cytokines (IL-6, IL-11, Leukemie Inhiberende Factor (LIF), Oncostatine M (OSM), Ciliaire Neurotrofe Factor (CNTF) en cardiotrofine 1), IL-1 type cytokines (IL-1 α , IL-1 β , TNF), Interferon γ (IFN γ), Transformerende Groei Factor β (TGF β), IL-8, e.a. Ze worden door verscheidene celtypes aangemaakt, maar in hoofdzaak door macrofagen, monocyten en endotheelcellen, die zich op de plaats van de inflammatie bevinden.

Zoals eerder vermeld spelen glucocorticoïden ook een belangrijke rol in de inductie van acute fase eiwitten. Zo kunnen bepaalde AFP's rechtstreeks door glucocorticoïden geïnduceerd worden, terwijl voor de inductie van andere AFP's glucocorticoïden synergistisch werken met cytokines. IL-6 is de belangrijkste induceerder van de meeste acute fase eiwitten, terwijl andere cytokines slechts de productie van een bepaalde subgroep van acute fase eiwitten kunnen beïnvloeden. In IL-6 deficiënte muizen is echter vastgesteld dat er nog steeds een sterke inductie is van acute fase eiwitten, na injectie met lipopolysacchariden, terwijl dit in veel mindere mate het geval is na injectie met terpentijn (wat een steriel absces veroorzaakt). Dit duidt erop dat het patroon van cytokine productie en de daaruit volgende acute fase respons kan verschillen naargelang de inflammatoire stimulus (Kopf, *et al.*, 1994). Hetzelfde fenomeen doet zich ook voor in IL-1 β deficiënte

muizen, maar dit is waarschijnlijk te wijten aan het feit dat IL-1 β vereist is om IL-6 te induceren na injectie van terpentijn (Fantuzzi, *et al.*, 1996).

Het komt waarschijnlijk zelden of nooit voor dat een cel wordt blootgesteld aan slechts één bepaald cytokine. In werkelijkheid worden cellen blootgesteld aan een combinatie van mediators die allen samen bepaalde relevante biologische informatie aan de cel doorgeven; het effect van een cytokine op een bepaalde doelcel kan geïnhibeed of versterkt worden door andere cytokines, door hormonen en door cytokine receptor antagonisten en circulerende cytokine receptoren. Combinaties van cytokines kunnen inderdaad zowel additief als inhiberend als synergistisch werken (Mackiewicz *et al.*, 1991).

Genexpressie van acute fase eiwitten wordt vooral op het transcriptioneel niveau gereguleerd en is heel complex (zie 1.3.3. Expressie van de agp genen). Posttranscriptionele regulatie mechanismen treden ook op. De regulatie gebeurt ter hoogte van de stabiliteit van het mRNA of ter hoogte van de translatie ervan en impliceert de interactie van een hele reeks eiwitten (McCarthy en Kollmus, 1995). Zo speelt het 5' onvertaald gebied van het serum amyloid A2 mRNA een belangrijke rol in de efficiëntie van de translatie initiatie, terwijl het 3' onvertaald gebied ervan een belangrijke rol speelt in de stabiliteit van het mRNA (Longley *et al.*, 1999). Daarnaast treden eveneens posttranslationele veranderingen op in de glycosylatie van een aantal acute fase eiwitten, die bovendien kunnen verschillen al naargelang de inflammatoire condities. Dit zijn voornamelijk wijzigingen in de vertakingsgraad van de suikerketens (Van Dijk *et al.*, 1995) en gewijzigde sialylatie- en fucosylatiepatronen (de Graaf *et al.*, 1993).

1.2.1.2. Veranderingen in het glycosylatiepatroon

Er werd gesuggereerd dat veranderingen in het glycosylatiepatroon van AFP's het gevolg zouden zijn van de selectieve verwijdering van bepaalde glycovormen uit de circulatie via lectine-achtige receptoren, zoals er op hepatocyten voorkomen (Ashwell en Harford, 1982). Een tweede hypothese was dat de kwalitatieve verandering van de AFP's het gevolg zou zijn van de kwantitatieve veranderingen ervan, in die zin dat de verhoogde productie in AFP's niet zou gecompenseerd worden door een verhoogde synthese of activiteit van bepaalde enzymen die instaan voor de glycosylatie van de AFP's (Raynes, 1982). Beide hypothesen bleken echter grotendeels verkeerd (Bierhuizen *et al.*, 1988; Parivar *et al.*, 1992). Er werd aangetoond dat de veranderingen in glycosylatiepatroon weliswaar door dezelfde cytokines gereguleerd worden die ook instaan voor de verhoogde productie van AFP's, maar dat beide processen onafhankelijk van elkaar verlopen (Mackiewicz *et al.*, 1992). Bovendien werd aangetoond dat er tijdens een inflammatoire toestand een verhoging is in de concentratie van bepaalde glycosyltransferasen, zoals sialyltransferase, die voor de wijziging in de carbohydraatstructuren zou kunnen instaan (Jamieson *et al.*, 1987).

De veranderingen in glycosylatiepatroon zijn verschillend tijdens acute en chronische inflammatie (Mackiewicz *et al.*, 1992; Breborowicz *et al.*, 1992). Bij mens en rat zullen er tijdens een acute inflammatie relatief meer bi-antennaire dan tri- en tetra-antennaire structuren zijn, terwijl dit bij chronische inflammatie het omgekeerde is. Bij de muis vermindert het aantal bi-antennaire structuren echter tijdens acute inflammatie, ten voordele van de tri- en tetra-antennaire structuren (Heegaard, 1992). Er zijn echter ook situaties gekend waarbij het glycosylatiepatroon van een bepaald AFP niet wijzigt (Mackiewicz *et al.*, 1987).

De gewijzigde glycosylatiepatronen spelen ongetwijfeld een rol tijdens de verdediging of aanpassing van de gastheer, aangezien verschillende glycovormen van een bepaald AFP verschillende biologische eigenschappen bezitten (De Graaf *et al.*, 1993; Durand, 1989; Pos *et al.*, 1989; Bennet en Schmidt, 1980; Costello *et al.*, 1979). Er wordt dan ook gepostuleerd dat wijzigingen in het glycosylatiepatroon een manier is om de eigenschappen van de AFP's optimaal aan te passen al naargelang de situatie.

I.2.2. Regulatie van andere acute fase veranderingen

Koorts is representatief voor de neuroendocriene veranderingen die de acute fase respons kenmerken. Hoewel verscheidene cytokines koorts kunnen induceren is het uiteindelijk IL-6 dat vereist is voor de finale stappen resulterend in een koortsrespons (Dinarello, 1997).

De gedragsveranderingen die vaak gepaard gaan met inflammatie zijn ondermeer anorexia, slaperigheid en lethargie. Deze worden eveneens geïnduceerd door cytokines. Net zoals bij de koortsrespons kunnen echter ook neurale mechanismen betrokken zijn bij anorexia.

Cytokines zijn ook betrokken in de pathogenese van bloedarmoede (anemie) tijdens chronische ziekte. Ze zijn betrokken in de verminderde responsiviteit van erythrocyt precursoren tegenover erythropoëetine (EPO), verminderde productie van EPO en verminderde vrijstelling van ijzer uit macrofagen (Means, 1995). Cachexia, het verlies van lichaamsgewicht tijdens ernstige chronische inflammatie is een gevolg van de afbraak van spieren, vetweefsel en beendermassa. IL-1 β , IL-6, TNF en IFN γ zijn betrokken bij al deze processen (Kotler, 2000).

I.2.3. Beëindigen van de acute fase respons

Niettegenstaande de korte halfwaardetijd van veel cytokines en RNA boodschappers die betrokken zijn in de acute fase respons, bestaan er toch actieve mechanismen om de acute fase respons te beëindigen; deze zijn er vooral op gericht pro-inflammatoire mediators neerwaarts te reguleren en zo de normale weefselfuncties te herstellen.

(i) Het glucocorticoïd hormoon, dat belangrijk is voor de inductie van acute fase eiwitten, kan de AFR negatief beïnvloeden door de productie van de initiërende en de secundaire cytokines door macrofagen en stroma cellen te inhiberen (Ray *et al.*, 1990). Dit impliceert

interacties tussen verscheidene domeinen van de glucocorticoïd receptor en andere transcriptie factoren als AP-1, NF κ B, e.a. (De Bosscher *et al.*, 1997)

(ii) De anti-inflammatoire cytokines IL-4, IL-10 en IL-13 onderdrukken de productie van TNF, IL-1, CXC chemokines en reduceren de expressie van cel adhesie moleculen op het endotheel. IL-10 en IL-13 doen dit vooral door de activatie van NF κ B te verhinderen (Lentsch *et al.*, 1997). IL-4 daarentegen werkt op een ander niveau en stimuleert vooral de afbraak van mRNA (Wang *et al.*, 1995). Daarnaast verhoogt IL-4 eveneens de apoptose van monocyten waardoor de accumulatie van deze cellen in de weefsels gereduceerd wordt (Mangan *et al.*, 1992).

(iii) Natuurlijk voorkomende antagonisten, zoals IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) en de oplosbare TNF receptoren (sTNFR) zijn ook sterke regulatoren van de AFR. De expressie van IL-1Ra wordt ondermeer geïnduceerd door IL-4 (Colotta *et al.*, 1992) en IL-10 (de Waal Malefyt *et al.*, 1992; Howard en O'Garra, 1992).

(iv) Een aantal acute fase eiwitten (o.a. CRP, α_1 -AT, α_1 -AGP) zijn eveneens in staat IL-1Ra te induceren via interactie met monocyten/macrofagen, en dit vooral in afwezigheid van LPS. In aanwezigheid van LPS daarentegen worden ongeveer gelijke hoeveelheden IL-1 β en IL-1Ra geproduceerd (Tilg *et al.*, 1993). Dit duidt erop dat acute fase eiwitten een dubbele rol vervullen: enerzijds amplificeren ze de inflammatoire respons zolang het pathogen nog aanwezig is en anderszijds onderdrukken ze de respons wanneer het pathogen vernietigd is (Tilg *et al.*, 1997).

(v) IL-6, dat meestal beschouwd wordt als een pro-inflammatoir cytokine, bezit echter ook een aantal anti-inflammatoire eigenschappen, die parallelle negatieve terugkoppelingslusen vormen om de acute fase respons te beëindigen. Zo kan IL-6 de synthese van IL-1Ra opreguleren en de vrijstelling van TNF-receptoren van hun celmembraan induceren (Tilg *et al.*, 1994). Het inhibeert bovendien de vrijstelling van TNF en IL-1 door monocyten, op transcriptieel niveau (Schindler *et al.*, 1990).

(vi) SOCS ('suppressor of cytokine signaling') eiwitten zijn een familie van cytokine-induceerbare regulatoren die de eigen signalisatie kunnen inhiberen (Gisselbrecht, 1999).

I.2.4. Functie van de acute fase respons

Er wordt algemeen aangenomen dat de verandering in plasma concentratie van de acute fase eiwitten positief is voor het organisme. Dit wordt afgeleid uit de reeds gekende functionele eigenschappen van een aantal acute fase eiwitten en uit logische speculatie hoe deze eigenschappen tot nut kunnen zijn tijdens inflammatie, genezing, of aanpassing aan een schadelijke stimulus.

Over de mogelijke voordelen van de andere acute fase fenomenen is het vooral speculeren geblazen. Slaperigheid heeft waarschijnlijk tot doel de energiebehoefte te reduceren. Koorts wordt geassocieerd met een verhoging van de immuniteit en het stabiliseren van cel

membranen (Kluger *et al.*, 1997), inductie van hitte shock proteïnen en het creëren van een suboptimale temperatuur voor de vermenigvuldiging van microorganismen. Glucocorticoïden spelen een belangrijke rol in het behoud van de homeostase en moduleren de immuun en inflammatoire respons als reactie op verschillende schadelijke stimuli. Verhoogde vetconcentraties in het plasma kunnen een voedselbron zijn voor de cellen die betrokken zijn in de verdediging van het organisme en kunnen als substraat dienen voor de regeneratie van beschadigde membranen. Circulerende lipoproteïnen kunnen bovendien lipopolysacchariden binden en hun toxiciteit verlagen (Hardardottir *et al.*, 1994). Verlaagde ijzer niveaus in het plasma kunnen de vermenigvuldiging van microorganismen tegengaan, aangezien ijzer voor de meeste microorganismen een strikt noodzakelijke groeifactor is. Verhoogde productie van heem oxygenase en mangaan superoxide dismutase kan weefselschade als gevolg van zuurstofradicalen limiteren, terwijl Timp-1 (weefsel inhibitor van metalloproteïnase-1) de destructieve effecten van metalloproteïnen kan verlagen.

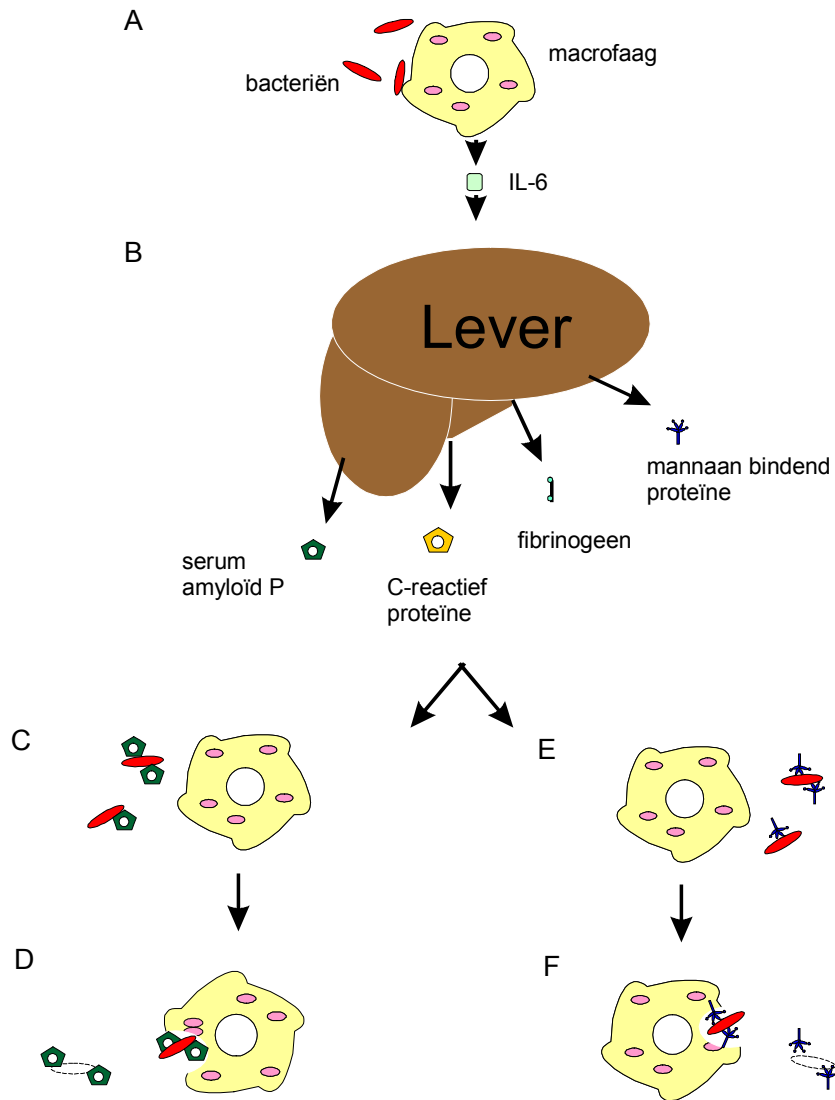
I.2.5. Rol van acute fase eiwitten en enkele voorbeelden

De gekende biologische functies van AFP's kunnen ingedeeld worden in 3 grote categorieën: verdediging en aanpassing van de gastheer, inhibitie van serine proteasen en transporteiwitten met antioxidans activiteit (Kushner en Mackiewicz, 1993).

I.2.5.1. Verdediging van de gastheer

Hiervan is C-reactief proteïne (CRP) het prototype AFP. CRP kan fosfocholine en galactanen binden en dus bepaalde pathogenen en fosfolipide componenten van beschadigde cellen herkennen (Kottgen *et al.*, 1992; Volanakis, 1982) (figuur I.5). Eliminatie van het gebonden partikel kan gebeuren doordat CRP het complement activeert (Kaplan en Volanakis, 1974), dat opsonizerend werkt, ofwel via directe interactie met fagocyterende cellen (Mortensen *et al.*, 1976). CRP bezit nog een aantal anti-inflammatoire, maar ook pro-inflammatoire eigenschappen. Zo verhindert het de adhesie van neutrofielen aan het endotheel door de expressie van L-selectine te verlagen; het inhibeert de superoxide productie door neutrofielen en stimuleert de synthese van inflammatoire cytokines, weefsel factor (TF) en IL-1Ra door monocytten. CRP oefent dus waarschijnlijk meerdere taken uit tijdens het inflammatoir proces.

Manaand bindend eiwit (MBP) bindt specifiek op terminale, niet-reducerende suikers als N-acetylglucosamine, mannose, fucose en glucose residu's (Ezekowitz *et al.*, 1988; Kawasaki *et al.*, 1978), die bij bepaalde pathogenen voorkomen (Figuur I.5). Het kan het complement activeren via de lectine pathway (Malhotra *et al.*, 1994), waarbij C3b gevormd wordt dat als opsonine optreedt en waarbij een 'membraan aanvallend complex' (MAC) gevormd wordt. Daarnaast bezit MBP ook een cytotoxische activiteit die onafhankelijk werkt van complement activatie (Ma *et al.*, 1999). Normale dierlijke cellen, zoals circulerende bloedcellen worden

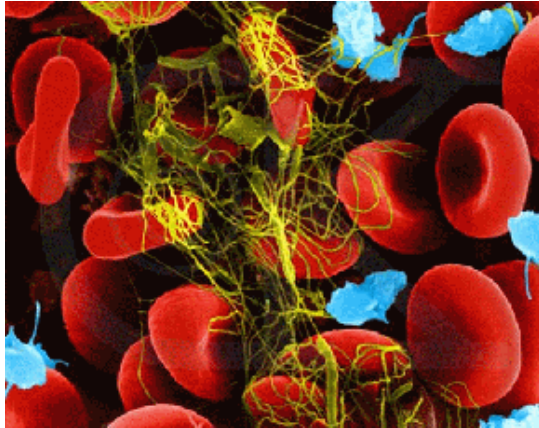


Figuur 1.5: (A) Een inflammatoire stimulus (hier een bacteriële infectie) activeert macrofagen. (B) IL-6 induceert de synthese van acute fase eiwitten in de lever. (C-D) CRP bindt bacteriën, resulterend in lyse of opsonisatie van de bacteriën. (E-F) MBP bindt eveneens bacteriën, leidend tot lyse of fagocytose.

niet gebonden door MBP, waarschijnlijk omdat hun oppervlak bedekt is met complexe suikers die eindigen op siaalzuren. Getransformeerde cellen of viraal geïnfecteerde cellen zullen echter gewijzigde suikerstructuren aan hun celoppervlak vertonen, die wel door MBP kunnen gebonden worden (Ohta *et al.*, 1994).

Fibrinogeen speelt een belangrijke rol in weefselherstel en wondheling (Doolittle, 1984). Het bindt geactiveerde bloedplaatjes en erythrocyten, cross-linkt deze en herstelt zo de structurele integriteit van het beschadigde bloedvat (Marguerie *et al.*, 1985) (Figuur 1.6).

Fibrinogeen en fibrine interageren ook met endotheelcellen en bevorderen de adhesie, beweeglijkheid en cytoskelet organisatie ervan (Dejana *et al.*, 1988). Ook haptoglobine helpt in de wondheling, vooral door de angiogenese te stimuleren (Cid *et al.*, 1993).



Figuur I.6: Fibrine netwerk (geel) dat de erythrocyten (rood) cross-linkt. Trombocyten (blauw) maken ook deel uit van de bloedklot.

I.2.5.2. Inhibitoren van serine proteasen

Tijdens een inflammatoire toestand worden een aantal serine proteasen geactiveerd of vrijgesteld uit fagocyterende cellen of door microorganismen. Wegens hun agressief karakter, is het wenselijk dat ze hun activiteit enkel op de plaats van de inflammatie uitoefenen en niet daarbuiten. Om de serine protease activiteit in de circulatie te inhiberen zijn er een aantal AFP's die optreden als serine protease inhibitoren (serpines) en die dus de integriteit van de weefsels beschermen. Er dient echter opgemerkt dat niet alle leden van de serpine-superfamilie ook serine protease inhibitoren zijn (bv. angiotensine en ovalbumine). α_1 -proteïnase inhibitor (α_1 -PI) is wel een typisch serpine. Het inhibeert neutrofiel elastase, terwijl α_1 -antichymotrypsine chymotrypsine-achtige proteasen inhibeert (neutrofiel cathepsine G, mastcel chymase) (Travis en Salvesen, 1983). Een andere belangrijke eigenschap van serpines is hun extreme gevoeligheid aan proteolytische inactivatie door proteïnasen die ze niet inhiberen (Mast *et al.*, 1991); dergelijke proteolytisch gemodificeerde serpines hebben een cytokine-achtige werking. Zo is proteolytisch gemodificeerd (α_1 -PI) chemotactisch voor neutrofielen (Banda *et al.*, 1988) en kan het zijn eigen synthese door monocyten stimuleren (Perlmutter *et al.*, 1988). Naast inflammatoire proteïnasen reguleren serpines ook coagulatie (bv. antithrombine-III), fibrinolyse (bv. α_2 -antiplasmine) en complement (bv. C1-inhibitor) (Salvesen en Engild, 1993).

I.2.5.3. Transporteiwitten met antioxidans activiteit

De AFP's die tot deze groep behoren spelen een belangrijke rol in de bescherming van de gastheer tegen toxische zuurstofmetabolieten, die door fagocyterende cellen vrijgesteld worden (Halliwell en Gutteridge, 1990). Indien ze niet geneutraliseerd worden, veroorzaken dergelijke metabolieten schade aan de cellen van de gastheer. Ceruloplasmine staat in voor het kopertransport; op deze manier wordt de door het koper ion gestimuleerde vorming van reactieve zuurstofmetabolieten, H_2O_2 en superoxide, geïnhibeerd (Gutteridge en Smith, 1988). Hemopexine bindt heem, dat vrijgesteld wordt uit beschadigde, heem-bevattende eiwitten (Cid *et al.*, 1993), terwijl haptoglobine het hemoglobine bindt, dat vrijgesteld wordt

tijdens hemolyse. Het is belangrijk dat vrij hemoglobine opgeruimd wordt aangezien dit vet peroxidatie kan versnellen, wat op zich weer leidt tot de vorming van toxische metabolieten (McCormick en Atassi, 1990).

I.2.5.4. Rol van negatieve acute fase eiwitten

Het is niet duidelijk welke functionele voordelen verbonden zijn aan de daling in concentratie van de negatieve acute fase eiwitten. Logischerwijs wordt aangenomen dat de verminderde productie van eiwitten die niet nodig zijn voor de verdediging van het organisme de nood aan aminozuren tijdens de verhoogde synthese van de positieve acute fase eiwitten compenseert. Het is ook mogelijk dat de verminderde synthese van negatieve acute fase eiwitten een meer actieve rol speelt tijdens inflammatie. Zo kan bijvoorbeeld de verminderde synthese van transthyretine deel uitmaken van een positieve terugkoppelingslus, aangezien dit eiwit de productie van IL-1 door monocyten en endotheelcellen inhibeert (Borish *et al.*, 1992).

Het is duidelijk dat de biologische rol van een aantal acute fase eiwitten niet zomaar eenduidig kan vastgelegd worden, gezien ze soms op meerdere fronten actief zijn, en soms zowel pro- als anti-inflammatoire eigenschappen vertonen. Bovendien is van een aantal acute fase eiwitten (bv. Serum amyloid A (SAA), α_1 -zuur glycoproteïne (α_1 -AGP), α_2 -macroglobuline, (α_2 M)) de eigenlijke biologische functie nog niet gekend.

I.3. α_1 -ZUUR GLYCOPROTEINE

α_1 -Zuur Glycoproteïne (α_1 -AGP, AGP) werd ongeveer terzelfdertijd beschreven door Dr. Richard J. Winzler (Weimer *et al.*, 1950) en door Dr. Karl Schmid (Schmid *et al.*, 1950). Dr. Winzler bestudeerde in perchloorzuur oplosbare plasma eiwitten, waarvan AGP de belangrijkste fractie vormde. Dr. Schmid daarentegen onderzocht het supernatans van Cohn fractie V; onderzoek dat verricht werd in het laboratorium van Dr. Cohn zelf. Dit leidde in 1953 tot de zuivering, via fractionele precipitatie, en de kristallisatie van AGP door Dr. Schmid. AGP werd gekristalliseerd als Pb^{2+} -zout in de vorm van hexagonale bipyramiden (Schmid *et al.*, 1953). De kristallisatie van AGP werd later trouwens herhaald door Dr. McPherson (McPherson *et al.*, 1984). Naast AGP, slaagde Dr. Schmid erin om een totaal van 12 verschillende eiwitten te zuiveren uit het supernatans van Cohn fractie V, waarvan aangenomen werd dat er zich geen eiwitten meer in bevonden (Bürgi, 1989).

Er was echter al voor het eerst sprake van AGP – weliswaar nog niet onder deze benaming - in 1882; toen bemerkte men een rood-bruine substantie die in oplossing bleef nadat serum opgekookt werd. Deze eigenschap heeft later tot de eerste benaming van het eiwit geleid, namelijk 'orosomuroid' (Chiu *et al.*, 1977).

I.3.1. Biochemische eigenschappen van AGP

Humaan AGP is een zuur glycoproteïne met een isoëlectrisch punt van 2.7 en een moleculair gewicht van 41 - 43 kDa. De variatie in moleculair gewicht is te wijten aan de verschillende suikerketens die kunnen voorkomen en die 45 % van het moleculair gewicht uitmaken (Schmid *et al.*, 1977). Humaan AGP telt 5 N-gebonden suikerketens van het complexe type; er zijn geen O-glycosylaties aanwezig. Het is één van de weinige serum glycoproteïnen die zowel bi-, als tri- en tetra-antennaire structuren bezitten (Yoshima *et al.*, 1981). Alle suikerketens bevinden zich aan de buitenkant van het natieve AGP eiwit (Schmid, 1989).

Humaan AGP bestaat uit één enkele polypeptideketen van 183 aminozuren (Board *et al.*, 1986; Dente *et al.*, 1985). Dit zijn er 2 meer dan wat oorspronkelijk gepubliceerd werd door Schmid (Schmid, 1975). Er zijn 2 varianten van humaan AGP (ORM1 en ORM2), gecodeerd door 2 verschillende genen. Beide eiwitten verschillen in 21 aminozuren (Dente *et al.*, 1987). Muis en rat AGP bestaan uit 189 en 187 aminozuren respectievelijk en vertonen 49 % en 59 % homologie met humaan AGP (Fournier *et al.*, 2000). Van muis AGP zijn er ook 2 varianten, die elk door een ander gen gecodeerd worden terwijl er bij de rat slechts 1 agp gen en dus ook maar één AGP eiwit voorkomt (zie verder I.3.2. AGP gen- en eiwitstructuur en expressie).

AGP is een globulair eiwit dat voor 21% uit α -helices, 21% β -structuren, een eerder atypische structuur, de β -turn type II (daarvan zijn er 8) en voor 40% uit ongeordende

structuren bestaat (Aubert en Loucheux-Lefebvre, 1976). Er komen 2 disulfide bruggen voor in het eiwit (Ikenaka, 1972).

Op basis van de aminozuur sekwentie, werd een significante graad van homologie gevonden tussen AGP en humaan IgG (Schmid *et al.*, 1973), haptoglobine (Ikenaka *et al.*, 1972), retinol bindend eiwit (RBP) (Flower, 1996; Pervaiz en Brew, 1987) en het EGF-bindend domein van de EGF-receptor (Toh *et al.*, 1985).

AGP wordt vooral aangemaakt in de lever, door hepatocyten, maar extrahepatische synthese komt ook voor (zie verder I.3.3. Expressie van de agp genen). De afbraak ervan wordt eveneens door de lever gemedieerd; AGP bezit een normale halfwaardetijd van ongeveer 3 dagen. Na desialylatie wordt dit gereduceerd tot een paar minuten (Morell *et al.*, 1971); dit is te wijten aan de aanwezigheid van asialoglycoproteïne receptoren op hepatocyten, die specifiek eiwitten met eindstandige Gal of GalNAc structuren binden en opnemen (Weiss en Ashwell, 1988).

Een ander speciaal kenmerk van AGP is zijn ongewoon hoge oplosbaarheid in water en veel polaire organische solventen (bv. methanol) (Kodicek *et al.*, 1995); zelfs gedenatureerd AGP is nog heel goed oplosbaar (Schmid, 1989).

I.3.2. AGP gen- en eiwitstructuur en expressie

De moleculaire biologie van de agp genen is gestart met het kloneren van het agp cDNA uit rat lever, rat HTC cellen, humane lever en muis lever. De resultaten van de cDNA analyse hebben aangetoond dat er bij de mens en de muis meer dan één gen geëxprimeerd werd. Karakterisatie van genomische agp kloons leerde uiteindelijk dat er in de rat slechts één agp gen is, terwijl er bij de mens 2, bij *Mus musculus domesticus* 3 en bij *Mus caroli* 8 agp genen zijn.

I.3.2.1. Humaan AGP

I.3.2.1.1. Gen- en eiwitstructuur

De meeste mensen bezitten twee agp genen, *agpA* en *agpB*, coderend voor de proteïnen AGPA (ORM1) en AGPB (ORM2) respectievelijk. Beide proteïnen verschillen in 21 az. Bij sommige mensen kan echter nog een derde agp gen voorkomen dat ofwel structureel homoloog is aan het *agpA* gen (*agp1A*) ofwel identiek is aan het *agpB* gen (*agpB'*) (Nakamura *et al.*, 2000; Merrit *et al.*, 1990; Dente *et al.*, 1987). De agp genen zijn gelegen op chromosoom 9q32-34 in een regio van 18 kb (Lögberg en Wester, 2000; Cox en Francke, 1985). In de menselijke populatie werden verscheidene polymorfismen gevonden van de agp genen (Sebetan *et al.*, 1997). De meest courante zijn echter 3 allelen van het *agpA* gen, die het resultaat zijn van een A→G transitie in de codons die coderen voor de aminozuren op positie 20 in exon 1 en positie 156 in exon 5. Dit resulteert in een ORM1*F1 eiwit (CAG: Gln

en GTG: Val), een ORM1*F2 (CAG: Gln en ATG: Met) en een ORM1*S eiwit (CGG: Arg en GTG: Val). 'F' en 'S' staan voor 'Fast' en 'Slow' omdat de mutatie resulteert in een eiwit dat snel of traag migreert tijdens gelelectroforese (Yuasa *et al.*, 1997). Zoals reeds vermeld, verschilt de aminozuur sekwentie van ORM1 en ORM2 op 21 plaatsen (Dente *et al.*, 1987), waardoor ORM2 iets basischer is dan ORM1. De meeste van deze aminozuur substituties zijn het gevolg van slechts één basesubstitutie (Schmid, 1989). De algemene structuur van beide eiwitten is echter grotendeels dezelfde (Merrit en Board, 1988), hoewel er een verschil kan zijn in drug bindingscapaciteit (Jolliet *et al.*, 1998).

I.3.2.1.2. Expressie

Bij de mens is het vooral *agpA* dat geëxprimeerd wordt in de lever; *agpB* wordt zeker 100x minder geëxprimeerd dan *agpA*. Ook tijdens een acute fase respons, opgewekt in de humane hepatoma cellijn Hep3B, was het vooral het *agpA* gen dat sterker geëxprimeerd werd, terwijl *agpB* niet reageerde op de acute fase stimulus (Dente *et al.*, 1987). De reden waarom *agpB* zo zwak geëxprimeerd wordt is niet duidelijk; de 5' gelegen DNA sekwenties zijn nochtans bijna identiek bij de drie genen en bevatten alle informatie die nodig is om transcriptie te starten van de stroomafwaarts gelegen sekwenties. Een mogelijkheid is dat informatie gelegen in de introns verantwoordelijk is voor de differentiële expressie van de genen. Een andere mogelijke verklaring is een positioneel effect, waarbij transcriptie hoofdzakelijk gelimiteerd wordt tot het eerste gen in de cluster (wat bijvoorbeeld ook het geval is bij de haptoglobine genen (Bensi *et al.*, 1985)). Een derde mogelijkheid is dat transcriptie van het eerste gen interfereert met transcriptie van de volgende genen in de cluster; zo zou bij de duplicatie van het *agpA* gen het terminatiesignaal gedeeltelijk kunnen verloren gegaan zijn, waardoor het transcript van het *agpA* gen doorgelezen wordt en zo transcriptie van de stroomafwaarts gelegen genen inhibeert (Proudfoot, 1986).

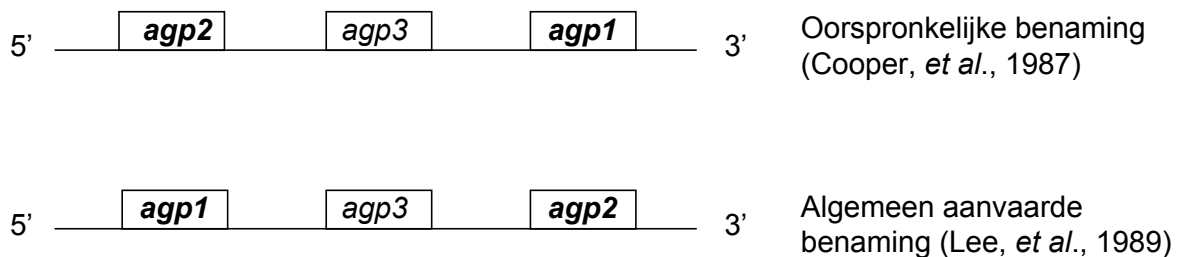
I.3.2.2. Muis AGP

I.3.2.2.1. Gen- en eiwitstructuur

Bij *Mus musculus domesticus* zijn 3 *agp* genen aanwezig, gelegen op chromosoom 4, in een cluster van 20 kb (eigen ongepubliceerde gegevens).

Over de benaming van de muis *agp* genen heerst in de literatuur enige verwarring: er is een *agp1*, een *agp2* en een *agp3* gen. Over dit laatste gen is er geen verwarring mogelijk: het bevindt zich tussen beide andere genen in de cluster. Wat echter oorspronkelijk door de groep van Papaconstantinou (Cooper *et al.*, 1987) het *agp1* gen genoemd werd (omdat de genomische sekwentie ervan als eerste in de literatuur beschreven werd), is later het *agp2* gen geworden. De reden daarvoor is waarschijnlijk omdat het tweede *agp* gen dat in de

literatuur beschreven werd, het meest 5' gelegen gen in de cluster bleek te zijn; vandaar dat deze auteurs hun gen ook het *agp1* gen genoemd hebben en het andere dan maar *agp2* genoemd hebben (Lee *et al.*, 1989). In de literatuur die daarop volgde hebben de meeste auteurs de benaming van Lee overgenomen en niet deze van Papaconstantinou, die zijn eigen benaming is blijven gebruiken (figuur I.7). Door deze spraakverwarring zijn een aantal fouten in de literatuur verschenen, zoals bijvoorbeeld het geval is in een overzichtartikel over AGP door Fournier (Fournier *et al.*, 2000), waar de benaming van Papaconstantinou en van Lee door elkaar gebruikt wordt. Voor alle duidelijkheid, wij gebruiken de algemeen aanvaarde benaming van Lee.



Figuur I.7: Voorstelling van de verschillende benamingen voor de muis *agp* genen die in de literatuur gebruikt worden.

Muis AGP bevat 189 aminozuren en is voor slechts 49 % homolog met humaan AGP. Van het *agp1* gen zijn er twee allelische varianten; *agp1A* en *agp1B*. Beide verschillen in slechts 1 base (A → G), wat leidt tot een aminozuur substitutie (Gln → Arg). Het *agp1A* allel komt voor bij AKR/J, SJL/J en SWR/J muizen, terwijl *agp1B* voorkomt bij BALB/c, DBA/2, C57BL/6, B10 en A/J muizen (Lee *et al.*, 1989).

De sekventie van het *agp2* en het *agp3* gen is gelijkaardig, maar er zijn toch 2 grote verschillen: in het *agp3* gen ontbreken 86 nucleotiden in intron 1 en in het *agp2* gen is er een extra (GT)₂₈ in intron 5 aanwezig (Chang *et al.*, 1992).

I.3.2.2.2. Expressie

Het constitutief niveau van AGP1 is ongeveer 5x hoger dan dat van AGP2 (Chang *et al.*, 1992). Bovendien is het de verhoging van het *agp1* mRNA dat verantwoordelijk is voor de grootste verandering in de *agp* mRNA pool tijdens een acute fase respons. Tijdens een chronische inflammatie echter neemt de expressie van het *agp2* gen de bovenhand (Glibetic en Baumann, 1986).

Het *agp3* gen wordt 2 grootte-orden minder overgeschreven dan het *agp2* gen. Een mogelijke verklaring daarvoor is de aanwezigheid van structurele afwijkingen in de introns. In het *agp3* gen ontbreken namelijk 86 nucleotiden in het eerste exon en een (GT)₂₈ opeenvolging in het vijfde intron. De 86 nucleotiden in het eerste intron kunnen belangrijk zijn voor de splicing, waardoor het *agp3* mRNA niet efficiënt gespliced wordt. Anderzijds kunnen

GT-opeenvolgingen een Z-DNA structuur vormen die genregulatorische eigenschappen kan bezitten. Het lage expressieniveau kan echter ook te wijten zijn aan een positioneel effect ((Proudfoot, 1986); zie hoger). Het *agp3* gen codeert voor een eiwit dat in 45 aminozuur substituties verschilt van AGP2. Bovendien zijn er slechts 3 potentiële N-glycosylatieplaatsen aanwezig (tegenover 5 en 6 voor AGP1 en AGP2 respectievelijk). Een AGP3 eiwit werd echter nog niet gedetecteerd.

Bij *Mus caroli*, een wilde muizesoort uit Zuidoost Azië die 5-10 miljoen jaar geleden gedivergeerd is van de voorouders van de huidige muis en rat inteelt stammen, werden 8 *agp* genen, die zich binnen een locus van 45 kb bevinden, gekarakteriseerd. Enkel de meest 5' (*agp1*) en de meest 3' (*agp8*) gelegen genen worden geëxprimeerd in de lever (Prowse, en Baumann, 1990); het zijn de structurele homologen van respectievelijk *agp1* en *agp2* bij *Mus musculus domesticus*.

I.3.2.3. Rat AGP

Rat AGP wordt gecodeerd door slechts één gen, gelegen op chromosoom 5. Het rat *agp* gen codeert voor een eiwit van 187 aminozuren.

Alle tot nog toe gekloneerde *agp* genen van zoogdieren vertonen een identieke algemene organisatie in hun overgeschreven regio. Er zijn 6 eiwit-coderende exons binnen een transcriptie-eenheid van 3.2 tot 3.5 kb. Ook in niet-coderende *agp* genen is diezelfde structuur bewaard gebleven.

I.3.2.4. *agp* genduplicaties

Vergelijking van de humane *agp* genen met de *agp* genen bij knaagdieren heeft aangetoond dat ondanks de divergentie op het nucleotide niveau er geen substantiële verschillen zijn in de structurele organisatie ervan. Humaan *agpA* en *agpB* zijn ontstaan door een genduplicatie na de mens-knaagdier divergentie. Deze duplicatie is mogelijks het gevolg van een cross-over tussen niet-allelische *Alu* sekwenties (Merrit *et al.*, 1990). Eenmaal een initiële duplicatie ontstaan is, kan een ongelijke cross-over tussen twee *in tandem* gelegen genen resulteren in een verdere toename van het aantal gencopijen, wat de aanwezigheid van drie *agp* genen verklaart bij bepaalde mensen (Nakamura *et al.*, 2000; Prowse en Baumann, 1990). Het groter aantal *agp* genen bij *M. caroli* in vergelijking met de rat en met andere *Mus* species wijst er eveneens op dat de amplificatie van de *agp* genen gebeurd is pas nadat deze knaagdieren evolutionair zijn gedivergeerd (Prowse en Baumann, 1990).

I.3.3. Expressie van de agp genen

De interesse voor AGP als studie object van moleculair-biologen is grotendeels te wijten aan de multi-hormoon-responsiviteit van de agp genen en het weefsel- en ontwikkelingsspecifieke expressiepatroon ervan. Ook genetici zijn geïntrigeerd door de agp genen, wegens de species specifieke genduplicaties ervan (Baumann *et al.*, 1989a). De acute fase gemedieerde veranderingen van de agp genexpressie in hepatocyten bleek in verscheidene species redelijk impressionant en evolutionair bewaard gebleven. Het ophelderen van de moleculaire mechanismen achter de genexpressie was bedoeld om regulatorische mechanismen te ontrafelen, die ook voor andere acute fase eiwitten zouden gelden. Er is inderdaad gebleken dat een aantal regulatorische kenmerken van de agp genexpressie een algemeen gegeven zijn voor andere acute fase eiwitten (zoals bv. cytokine regulatorische elementen en factoren die *in trans* werken). Anderzijds werden ook unieke regulatorische elementen gevonden (bv. glucocorticoïd regulatie). Naast de expressie in de hepatocyten, werd er ook agp expressie waargenomen in een aantal andere cellen en weefsels.

I.3.3.1. Plasma concentratie van AGP

De plasma concentratie van AGP is variabel, zelfs in een gezond individu. Bij de mens is dit 0.36 tot 1.46 mg/ml, met een gemiddeld niveau van 0.77 mg/ml (Blain *et al.*, 1985). De dagelijkse variaties kunnen zelfs tot 49 % bedragen (Yost en DeVane, 1985); vooral omgevingsfactoren - en in mindere mate genetische - liggen aan de basis van deze variatie (Blain *et al.*, 1985). De AGP concentratie is laag in de foetus; voor 16 weken is het eiwit nauwelijks detecteerbaar. Tijdens de ontwikkeling begint de concentratie lichtjes te stijgen, maar de verhouding AGP in de foetus ten opzichte van de moeder is nog altijd slechts 0.37 bij de geboorte (Krauer *et al.*, 1984). Tijdens de eerste week na de geboorte is er een sterke stijging, als gevolg van een acute fase respons, die met de geboorte gepaard gaat (Marchini *et al.*, 2000). Vervolgens neemt de concentratie gestaag toe, tot op de leeftijd van 1 jaar de volwassen concentratie bereikt wordt (Bienvenu *et al.*, 1981).

De magnitude van de AGP concentratie verandering in het plasma tijdens een acute fase respons is afhankelijk van species tot species, en kan oplopen van 2 tot 100x (Baumann *et al.*, 1993a; Ray en Ray, 1991; Clawson en Button, 1986; Cooper en Papaconstantinou, 1986; Ricca *et al.*, 1981). Deze veranderingen in plasma concentratie zijn hoofdzakelijk te wijten aan veranderingen in agp gentranscriptie (Baumann en Maquat, 1986; Kulkarni *et al.*, 1985). Posttranscriptionele regulatie werd ook gesuggereerd. Dit was het gevolg van de waarneming dat in bepaalde gevallen de omvang van de verandering in transcriptiesnelheid van het agp gen onvoldoende is om de verandering in agp mRNA accumulatie te verklaren. Daarom werd gedacht dat cytokines/hormonen ook posttranscriptionele processen zouden

beïnvloeden. De halfwaardetijd van cytoplasmatisch agp mRNA wordt alvast niet beïnvloed door behandeling met hormonen. Daarom werd gesuggereerd dat het posttranscriptioneel effect ter hoogte van de 'processing' en de export van het nucleair transcript zou liggen. Alhoewel er inderdaad een verkorting van de polyA staart van matuur agp mRNA optreedt lijkt dit toch niet verantwoordelijk te zijn voor een verandering in mRNA concentratie (Carter *et al.*, 1989; Shiels *et al.*, 1987;). Voorlopig kon een eventueel mechanisme voor posttranscriptionele regulatie van agp expressie nog niet opgehelderd worden. De posttranslationale regulatie van AGP wordt verder besproken (zie verder I.3.4. Glycosylatie van AGP).

I.3.3.2. Hormonale stimulatie van agp genexpressie in de lever

Aangezien genregulatie een moeilijk te bestuderen proces is *in vivo*, werden weefsel-cultuur systemen van hepatocyten ontwikkeld die *ex vivo* nog steeds de mogelijkheid bezaten om het agp gen te reguleren en toelieten om potentiële regulatoren van de agp genexpressie rechtstreeks te testen (Baumann, 1989c). Veel van het oorspronkelijke werk werd dan ook uitgevoerd op primaire celculturen. Toen echter rat (HTC, Fao en H-35) en humane (HepG2 en Hep3B) hepatoma cellijnen ontwikkeld werden, die agp genexpressie op dezelfde manier reguleerde als in een normale lever, werd de karakterisatie van verschillende regulatorische componenten van de agp genexpressie een stuk eenvoudiger (Baumann *et al.*, 1993b).

IL-1, TNF, IL-6 en glucocorticoïden zijn de belangrijkste modulators voor agp genexpressie in levercellen van o.a. mens, rat en muis (Alam en Papaconstantinou, 1992; Baumann en Gauldie, 1990; Baumann *et al.*, 1989b). Meestal werken combinaties van deze drie zelfs synergistisch (Alam *et al.*, 1993; Baumann *et al.*, 1987). Het werkingsmechanisme van deze modulators is heel gelijkaardig in cellen afkomstig uit de mens of afgeleid uit knaagdieren, maar er zijn toch ook een aantal cellijn-specifieke verschillen te noteren.

Zo is bij knaagdieren de maximale respons op de combinatie van IL-1 en TNF hoger dan die van IL-6, terwijl dit niet het geval is bij de mens. Rat hepatocyten vormen een uitzondering in die zin dat glucocorticoïden, zoals dexamethasone, sterke agp genexpressie induceren in de afwezigheid van cytokines (Fournier *et al.*, 1994). AGP genexpressie in de rat is dus een goed model om het moleculair mechanisme te bestuderen van glucocorticoïd-geïnduceerde genexpressie.

Ook IL-8 kan de AGP productie verhogen in geïsoleerde humane hepatocyten (Wigmore *et al.*, 1997). Naast cytokines en glucocorticoïden werd aangetoond dat retinoïnezuur een rol kan spelen bij de inductie van acute fase eiwitten. Wat betreft agp expressie, is retinoïnezuur in staat om de IL-6 respons te verhogen, maar werkt het als een negatieve modulator van de glucocorticoïd geïnduceerde agp mRNA synthese (Li *et al.*, 1998; Koj *et al.*, 1995).

I.3.3.2.1. *agp* genregulatie bij de rat

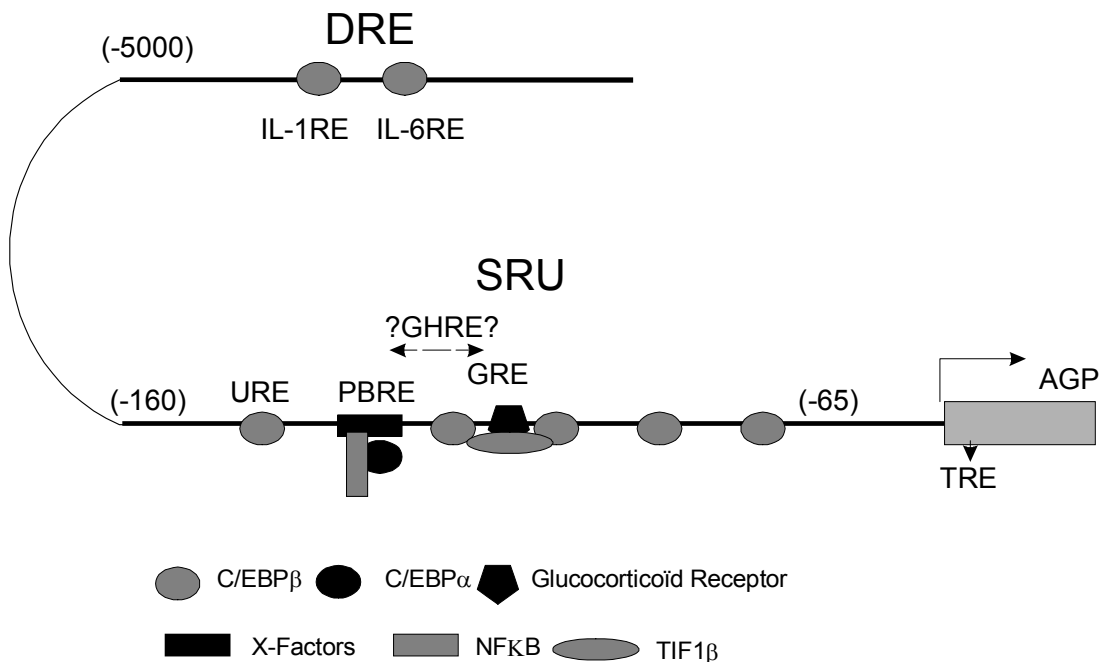
I.3.3.2.1.1. Steroïd responsieve unit en glucocorticoïd responsief element van het rat *agp* gen

Stabiele transfectie van het rat *agp* gen, inclusief verscheidene 100en bp 5' flankerend DNA, in muis fibroblasten (L-cellen), heeft aangetoond dat dexamethasone stimulatie mogelijk was en dezelfde karakteristieken vertoonde als in hepatocyten. De expressie van het *agp* gen gebeurt dus onafhankelijk van lever-specifieke transcriptiefactoren (Reinke en Feigelson, 1985). Dit effect wordt gemedieerd door de 'steroïd responsieve unit' (SRU) van het rat *agp* gen. Binnen de SRU bevinden zich een 'glucocorticoïd responsief element' (GRE) en C/EBP β bindingsplaatsen (C/EBP β = CCAAT/enhancer bindend proteïne β , ook nog AGP/EBP (Chang *et al.*, 1990), LAP (Descombes *et al.*, 1990), NF-IL-6, NF-AB of IL-6DBP genoemd (Baumann *et al.*, 1992)) (figuur I.8). Deze spelen ook een belangrijke rol bij cytokine-inductie van het *agp* gen. Het GRE werd uiteindelijk geïdentificeerd op positie -120 tot -107 van de transcriptie startplaats verwijderd (Baumann en Maquat, 1986). Voor maximale inductie door glucocorticoïden zijn de C/EBP β bindingsmotieven vereist. Er zijn 3 C/EBP β bindingsplaatsen die stroomafwaarts van het GRE gelegen zijn (-113 tot -104; -81 tot -72 en -102 tot -93). Deze laatste is niet relevant voor glucocorticoïd stimulatie, aangezien mutaties binnen die sekwentie zonder gevolg bleven (Williams *et al.*, 1991). Anderszijds overlapt het eerste C/EBP β bindingselement met het GRE. De GR activeert *agp* gen transcriptie ondermeer door C/EBP β te recruter en het gebonden te houden aan zijn doel sekwenties. Daarnaast zorgt dexamethasone toediening ook voor een weefsel-specifieke wijziging in de chromatine structuur van de SRU (Savoldi *et al.*, 1997). De synergistische werking van cytokines en glucocorticoïden is te wijten aan eiwit-eiwit interacties tussen C/EBP β en de glucocorticoïd receptor (Nishio *et al.*, 1993). Er werd nog een derde factor geïdentificeerd, TIF1 β die transcriptie van het *agp* gen door de GR en C/EBP β stimuleert (figuur I.8). TIF1 β interageert rechtstreeks met de GR en de binding zelf is ligand onafhankelijk; activatie van de transcriptie door TIF1 β is echter wel ligand afhankelijk. C/EBP β gemedieerde activatie wordt eveneens door TIF1 β verhoogd. Waarschijnlijk is TIF1 β dus een mediator in de signaaltransductie pathways van zowel de glucocorticoïd als de cytokine gemedieerde *agp* geninductie (Chang *et al.*, 1998).

Naast glucocorticoïd inductie, werd er ook nog rat *agp* inductie waargenomen door triiodotyronine (T3). Deze inductie is te wijten aan de aanwezigheid van een tyroïd hormoon responsief element (TRE) in het eerste intron van het rat *agp* gen (Matsukawa *et al.*, 1996) (figuur I.8).

I.3.3.2.1.2. Het Distaal Regulatorisch Element

Cytokine (IL-1, TNF, IL-6) inductie van het rat *agp* gen wordt gemedieerd door DNA sekwenties die zich ver stroomopwaarts bevinden in het 5' aangrenzend gebied (- 5kb). Deze sekwenties worden het Distaal Regulatorisch Element (DRE) genoemd (figuur I.8). Het DRE, dat 142 bp groot is, kan onderverdeeld worden in een IL-1 responsief element (RE), dat zich uitstrekt van positie 1-36 in het DRE; een IL-6 RE (positie 76-97) en een forbol ester gevoelige NF κ B-achtige sekwentie (positie 45-55). Elk van deze elementen kan afzonderlijk functioneren, maar er is wel een sterk coöperatief effect, wanneer ze samen in één complex voorkomen. Het DRE bevat bindingsplaatsen voor transcriptiefactoren van de C/EBP familie. Aangezien cytokines de expressie van C/EBP β in de lever sterk opreguleren (Baumann *et al.*, 1992) is het waarschijnlijk dat deze isovorm een indirecte mediator is van het cytokine signaal voor *agp* geninductie (Baumann *et al.*, 1993a).



Figuur I.8: Regulatorische elementen en *in trans* werkende factoren betrokken bij de expressie van het rat *agp* gen. De rat *agp* promotor bevat verscheidene *in cis* werkende elementen binnen de steroid responsieve unit (SRU, -160 –65) die betrokken zijn bij de glucocorticoïd regulatie: het glucocorticoïd responsief element (GRE) wordt gebonden door de glucocorticoïd receptor die interageert met C/EBP β ; de stroomopwaarts gelegen responsieve elementen (URE) en andere regio's die interageren met C/EBP β . Het fenobarbital responsief element (PBRE) en de regio die waarschijnlijk betrokken is bij groei hormoon respons (GHRE) zijn eveneens binnen het SRU gelegen en interageren met ongekende factoren (X-Factors), NF κ B, TIF1 β en C/EBP α factoren. Het distaal responsief element (DRE) betrokken bij de cytokine inductie van het rat *agp* gen bevindt zich in de 'enhancer' regio en interageert met C/EBP β . Het tyroïd hormoon responsief element (TRE) bevindt zich in het eerste intron van het rat *agp* gen.

I.3.3.2.1.3. Functionele relevantie van het Distaal Regulatorisch Element

De functionele relevantie van het DRE werd nagegaan in transgene muizen (Dewey *et al.*, 1990). Er werden transgene muizen gemaakt met rat *agp* genomische sekwenties met en

zonder DRE. Beide lijnen produceerden rat AGP in de circulatie aan een concentratie die gelijk of hoger is aan deze gevonden in normale ratten. Expressie van het transgen is induceerbaar met dexamethasone en tijdens inflammatie, opgewekt door LPS. De muizen met het DRE bevattende transgen vertoonden een hogere respons op LPS dan na dexamethasone behandeling, terwijl de respons dezelfde was voor LPS en dexamethasone in de muizen zonder DRE. In primaire hepatocyten afgeleid van beide muis lijnen werd vastgesteld dat het DRE-bevattend transgen kon geïnduceerd worden met dexamethasone, IL-1 en IL-6 (afzonderlijk of in combinatie toegediend). Het transgen zonder DRE kon enkel door dexamethasone geïnduceerd worden. Dit illustreerde dus duidelijk dat het DRE *in vivo* nodig is voor cytokine inductie van het rat *agp* gen.

Opmerking: tijdens het doctoraat werd gebruik gemaakt van de rat *agp* transgene muizen mét DRE.

I.3.3.2.2. *agp* genregulatie bij de muis

Alhoewel *agp* genregulatie heel gelijkaardig is bij verschillende species, zijn de 'enhancer' sekwenties en de locatie ervan heel variabel.

Een eerste verschil in vergelijking met de rat is de aanwezigheid van 3 *agp* genen bij de muis. Gezien het *agp3* gen slechts op een heel laag niveau geëxprimeerd wordt, wordt hier verder niet op ingegaan. Het mRNA niveau van het *agp1* gen is hoger dan dat van *agp2*. De AGP genen in muis en rat lever worden gereguleerd met dezelfde hormoon specificiteit, uitgezonderd de respons op glucocorticoiden, die niet zo prominent is in de muis vergeleken met de rat (Baumann *et al.*, 1993a).

I.3.3.2.2.1. Het muis *agp* Glucocorticoïd Responsief Element

De nucleotide sekwentie van de muis en rat *agp* promotors vertoont veel homologie, vooral in de glucocorticoïd responsieve regio (GRE; -130 tot -70) van het *agp1* gen. Deze is identiek aan die van het rat gen, met uitzondering van één enkele basesubstitutie (C i.p.v. T op positie -110). Deze substitutie wijzigt de consensus glucocorticoïd receptor herkenningsplaats, waardoor het GRE bij de muis niet functioneel is (Prowse en Baumann, 1990). De binding van C/EBP β wordt echter niet verhinderd. De *agp2* promotor verschilt op een van de C/EBP β bindingsplaatsen in 3 nucleotiden van het *agp1* gen; dit heeft een negatieve invloed op de binding door C/EBP β . Er wordt dan ook gespeculeerd dat het lagere expressieniveau van *agp2* daar zou kunnen mee te maken hebben (Baumann *et al.*, 1993a).

I.3.3.2.2.2. Het muis *agp* Acute Fase Responsief Element

De AGP-inductie door LPS wordt gemedieerd door het acute fase responsief element (APRE), gelegen in de *agp1* promotor op positie -127 tot -104 van de transcriptie-initiatie plaats gelegen (Alam *et al.*, 1993; Alam en Papaconstantinou, 1992). Het APRE bevat een

C/EBP bindingsplaats die gedeeltelijk overlapt met het GRE. In normale omstandigheden is vooral C/EBP α gebonden op het APRE. Tijdens een AFR is er een sterke stijging in de concentratie van C/EBP β dat vervolgens de plaats van C/EBP α inneemt op het APRE.

Bij muis agp geninductie zijn er zowel positieve als negatieve transcriptiefactoren betrokken. In de 180 bp regio van de agp promotor zijn er 4 C/EBP β bindingsplaatsen (Chang *et al.*, 1990) aanwezig en een negatief *cis* element dat herkend wordt door een negatieve factor, nucleoline (Yang *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1993). De stijging in de concentratie C/EBP β tijdens een AFR is gekoppeld aan een verlaging in het nucleoline niveau, wat resulteert in agp gentranscriptie. Naast C/EBP β en nucleoline wordt agp gentranscriptie ook nog eens positief gereguleerd door de transcriptiefactoren YY1 (Lee en Lee, 1994), Nopp140 (Miau *et al.*, 1997) en NF κ B (Lee *et al.*, 1996). YY1 activeert transcriptie door de negatieve werking van nucleoline op te heffen, terwijl Nopp140 en NF κ B interageren met C/EBP β en op een synergistische manier genexpressie activeren.

I.3.3.2.3. Regulatie van agp gen expressie door andere moleculen/factoren

(i) fenobarbital (PB): PB induceert vooral drug metaboliserende enzymen in de lever (vooral cytochroom P450) maar is eveneens in staat agp expressie te induceren in ratten. De regulatie gebeurt vooral op het transcriptioneel niveau en is afhankelijk van C/EBP α en NF κ B. Het PB responsief element (PBRE) bevindt zich op positie -142 tot -126 van de transcriptie-startplaats (Mejdoubi *et al.*, 1999) (figuur I.8).

(ii) Groeihormoon (GH): agp gen expressie wordt door GH geïnhibeerd op het transcriptionele niveau. Een interessante observatie in dit verband was dat ratten waarvan de hypofyse verwijderd werd een sterk verhoogd agp mRNA niveau hadden in de lever. Na toediening van GH daalde dit niveau. Deze negatieve regulatie kan erop duiden dat GH een belangrijke endogene regulator is van constitutieve agp gen expressie. De regio in de rat agp promotor die verantwoordelijk is voor de GH-regulatie bevindt zich op positie -147 tot -123 van de transcriptie startplaats (Mejdoubi *et al.*, 1999) (figuur I.8).

(iii) Zware metalen: Hg, Cd, Pb, Cu, Ni en Zn zijn in staat *agp1* en *agp2* te induceren in de muis; de respons is vergelijkbaar met die van LPS (*agp1* wordt sterker geïnduceerd dan *agp2*) (Yiangou en Papaconstantinou, 1993).

(iv) Hyperthermie: Het exacte mechanisme van AGP-inductie als gevolg van hyperthermie is nog niet gekend. Er werd een stijging waargenomen in het niveau van C/EBP β en een daling van C/EBP α . In de C/EBP β promotor werden bovendien sekwenties gevonden die homologie vertonen met hitte shock elementen (HSE) die voorkomen in de promotor van hitte shock proteïnen (HSP). Deze kunnen gebonden worden door hitte shock transactiverende factoren en zo geninductie veroorzaken. Glucocorticoïden zijn ook betrokken bij de AGP inductie, aangezien deze veel lager is na hyperthermie in ratten zonder bijniere.

Cytokines zijn niet betrokken bij de door hyperthermie geïnduceerde geninductie (Yiangou *et al.*, 1998).

I.3.3.3. Extrahepatische agp genexpressie en -regulatie

In de literatuur zijn er regelmatig berichten verschenen over extra-hepatische expressie van agp en andere acute fase eiwitten. Het is echter pas recent dat men de regulatie van deze extrahepatische expressie is gaan bestuderen. Deze studies hebben de hypothese, dat een acute fase respons ook in extra-hepatische celtypes zou plaatsvinden en gereguleerd worden door inflammatoire mediators, algemeen doen aanvaarden. In tabel I.3 wordt weergegeven in welke celtypes en weefsels agp nog geëxprimeerd wordt.

EXTRAHEPATISCHE EXPRESSIE VAN AGP				
organen of celtypes	eiwit	mRNA	constitutief	induceerbaar
nier		+	-	+
vetweefsel		-		
milt		-		
thymus		-		
hart	+	-	+	
testes		-		
ileum	+			+
maag	+			+
colon	+		+	+
intestinale epitheelcellen		+		+
prostaat epitheelcellen	+			+
hersenen		-		
borst	+		+	+
borst epitheelcellen	+		+	
uterus			-	
decidua	+			+
long	+	-/+	-	+
long fibroblasten		+		+
pneumocyt II	+	+	-	+
alveolaire macrofagen	+	+	-/+	+
peritoneale macrofagen		-		
monocyten	+		+	+
lymfocyten	+		+	+
granulocyten	+		+	+
endotheelcellen	+	+	+	

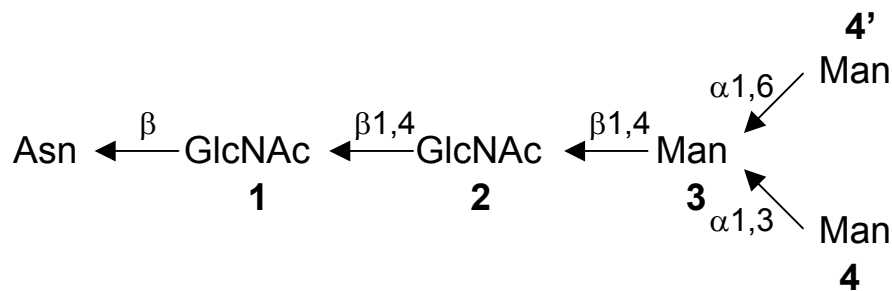
Tabel I.3: Extra-hepatische expressie van agp. De expressie (+) of de afwezigheid van expressie (-) van AGP eiwit en mRNA zijn weergegeven voor de extra-hepatische weefsels en celtypes die tot nu toe bestudeerd werden. Er werd aangeduid of het agp gen constitutief (basaal) of induceerbaar (inflammatie, kanker) geëxprimeerd wordt in de overeenkomstige weefsels of celtypes (Fournier *et al.*, 2000).

I.3.4. Glycosylatie van AGP

Tot de zuivering van galactoglycoproteïne - dat voor 76% geglycosyleerd is - werd AGP beschouwd als het zwaarst geglycosyleerde plasma eiwit (Akiyama *et al.*, 1984; Schmid *et al.*, 1980). Zoals reeds vermeld bestaat 45 % van z'n moleculair gewicht uit suikerketens. Humaan AGP bevat 5 N-gebonden suikerketens (Asn-15, -38, -54, -75, -85). Muis AGP1 en AGP2 bevatten respectievelijk 5 en 6 N-glycosylatieplaatsen. 4 ervan zijn sterk geconserveerd bij de mens, rat en de muis.

I.3.4.1. Microheterogeniteit van de suikerketens op het AGP eiwit

De basisstructuur van N-gebonden suikerketens is steeds een pentasaccharide en bestaat uit twee β -N-acetylglucosamine residu's (GlcNAc), een β -mannosyl (Man) en twee α -mannosyl moleculen. Ze zijn genummerd 1, 2, 3, 4 en 4' respectievelijk. Dit is het 'kern' oligosaccharide en daarop komen de N-acetyl lactosaminy (Gal β 1,4 GlcNAc) zijketens (figuur I.9).

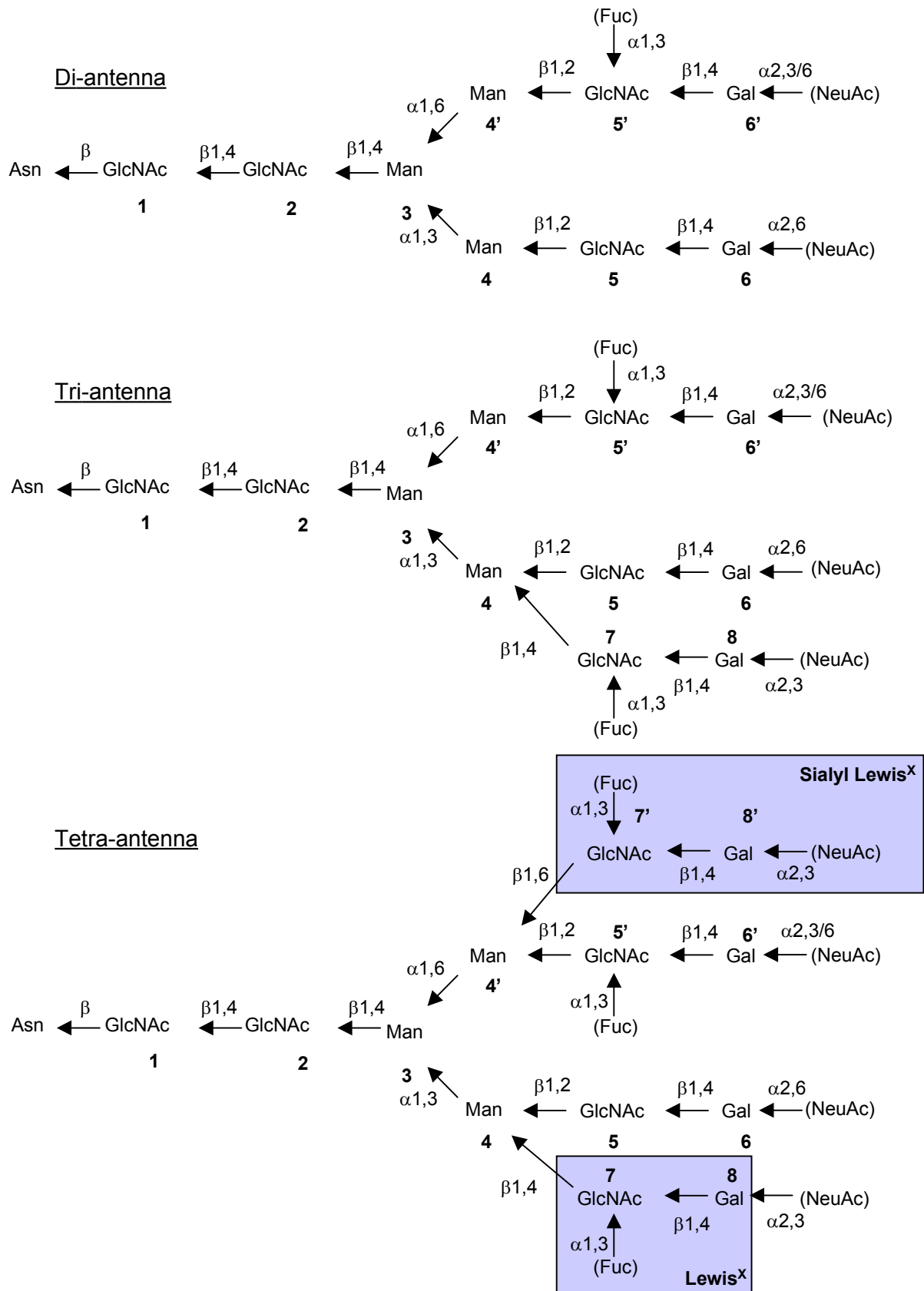


Figuur I.9: Het 'kern' oligosaccharide, startend met een GlcNAc residu gebonden op Asn.

Er is echter een zekere variatie mogelijk in de suikerketens; dit wordt microheterogeniteit genoemd. Er bestaan twee soorten microheterogeniteit: 'grote microheterogeniteit' slaat op verschillen in het aantal zijtakken op de suikerketens (bi-, tri- of tetra-antennair), terwijl 'kleine microheterogeniteit' doelt op variaties in het aantal siaalzuren of fucose moleculen op de suikerketens (Agneray, 1989).

I.3.4.1.1. 'Grote microheterogeniteit'

Bij een bi-antennaire structuur zijn beide N-acetyl lactosamine ketens via een beta 1,2 binding vastgehecht op beide mannoses, 4 en 4'. Bij tri-antennaire structuren is de derde zijketen op mannose 4 vastgehecht via een beta 1,4 binding. Bij een tetra-antennaire structuur tenslotte is de vierde zijketen via een beta 1,6 binding vastgehecht op mannose 4'. Deze zijketens worden 5, 5', 7 en 7' genoemd respectievelijk (Agneray, 1989) (figuur I.10).



Figuur I.10: Di-, tri- en tetra-antennaire N-gebonden complexe glycanen zoals ze kunnen voorkomen op humaan AGP. Alle mogelijkheden worden tussen haakjes weergegeven. Man: mannose; GLcNAc: N-Acetylglucosamine; Fuc: fucose; NeuAc: sialzuur; Gal: galactose. Fucose kan ook via een $\alpha 1-2$ binding vastgehecht worden (sLe^x, Le^x)

I.3.4.1.2. 'Kleine microheterogeniteit'

Neuraminezuur (NeuAc) of siaalzuur maakt 10–12% uit van de totale suikermassa en is verantwoordelijk voor de sterk negatieve lading van het eiwit. Samen met fucose is dit het meest voorkomende eindstandige suiker; daarbij komt nog dat ze elk in verscheidene conformaties aan de suikerketen gehecht kunnen worden. Neuraminezuur kan via een α 2-3 of een α 2-6 binding aan galactose vastgehecht worden (figuur I.10).

I.3.4.1.3. ConA reactiviteit van AGP

Microheterogeniteit kan bestudeerd worden via lectines; dit zijn glycoproteïnen die specifieke glycaanstructuren kunnen binden. Een veel gebruikt lectine is ConA. Dit lectine bindt α -gebonden (2-O-gesubstitueerde) mannose (Man) residu's, waarbij tenminste 2 Man moleculen nodig zijn voor de binding. M. a. w., ConA bindt enkel met bi-, maar niet met tri- en tetra-antennaire structuren (Bierhuizen *et al.*, 1988). In het geval van multiheteroglycaan eiwitten hangt de graad van ConA reactiviteit af van het aantal biantennaire structuren op het eiwit.

Zoals reeds vermeld, kan AGP uit normaal humaan serum, op basis van ConA reactiviteit in 3 varianten opgesplitst worden:

- (i) Con A niet-reactief (AGP-A) bevat géén bi-antennaire structuren (46%)
- (ii) Con A zwak reactief (AGP-B) bezit één biantennaire structuur (39%)
- (iii) Con A reactief (AGP-C) bevat twee bi-antennaire structuren (15%)

Elke glycosylatieplaats kan in principe gelijk welk van de glycanen bevatten die in figuur I.10 getoond worden. Daarbij komt nog dat de eindstandige suikers ook nog eens mee verantwoordelijk zijn voor een groot deel van de diversiteit tussen de suikerketens onderling. In theorie zou deze diversiteit in structuren leiden tot meer dan 10^5 verschillende glycovormen van het AGP eiwit, die elk een unieke combinatie van suikerketens bezitten op elk van de glycosylatieplaatsen. In realiteit komt dit echter niet voor, aangezien er wel degelijk bepaalde restricties zijn aan de glycosylatie-structuren op een bepaalde plaats in het AGP eiwit (Treuheit *et al.*, 1992).

- (i) glycosylatieplaats I draagt nooit een tetra-antennaire suikerketen
 - (ii) glycosylatieplaats II draagt nooit glycanen met fucose
 - (iii) glycosylatieplaats IV draagt nooit een di-antennaire suikerketen
 - (iv) enkel glycosylatieplaats IV en V kunnen suikerketens dragen met meer dan één fucose
- Zo komt het dat er in de praktijk slechts een 12-20 glycovormen van het AGP eiwit voorkomen in normaal serum .

I.3.4.2. Glycosylatieveranderingen tijdens inflammatie

Tijdens een inflammatoire toestand treden niet alleen veranderingen op in de concentratie van acute fase eiwitten. Er kunnen ook wijzigingen optreden in de distributie en samenstelling van de suikerketens. Beide processen worden echter onafhankelijk gereguleerd (van Dijk *et al.*, 1995; van Dijk *et al.*, 1994). Zo duurt de waargenomen verandering in glycosylatie van AGP bij zwaar verbrande personen veel minder lang dan de toename van de AGP concentratie (Pos *et al.*, 1990) en gaat de verhoogde AGP concentratie bij patiënten die leiden aan ernstige systemische *lupus erythematosus* niet gepaard met wijzigingen in glycosylaties.

Tijdens een acute inflammatie is er een transiënte afname in de graad van vertakking van de suikerketens op de humane AGP molecule (De Graaf *et al.*, 1993; Turner, 1992). Dit is een typisch fenomeen van de AFR en kan ook gedetecteerd worden tijdens de acute fase van chronische aandoeningen, zoals rheumatoïde arthritis (RA) (Pawlowski *et al.*, 1989). In bepaalde omstandigheden (bijvoorbeeld bij ernstige brandwonden) is er zelfs een nieuwe variant te detecteren (AGP-D, sterk ConA reactief) (van Dijk *et al.*, 1993). Het tegenovergestelde, een toename in de vertakkingsgraad, is te zien tijdens het verdere verloop van de chronische inflammatie. Bij chronische inflammatie werd zelfs een verband waargenomen tussen de vertakkingsgraad van de AGP suikerketens en de duur en ernst van de ziekte (Mackiewicz *et al.*, 1987). Ook in andere gevallen blijkt AGP microheterogeniteit een goede merker te zijn voor het klinisch stadium van inflammatie (Iijima *et al.*, 2000).

Een andere verandering die kan optreden is de graad van α 3-fucosylatie. α 3-Fucosylatie is trouwens de enige configuratie waarin fucose aanwezig is op AGP (De Graaf *et al.*, 1993). Tijdens acute inflammatie (ondermeer tijdens septische shock) is er een stijging van de fucosylatiegraad van AGP. Deze stijging in fucosylatie gaat gepaard met een verhoogde expressie van de sialyl Lewis^x (sLe^x: NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)-GlcNAc-R) en de niet gesialyleerde Le^x determinant (Brinkman-Van der Linden *et al.*, 1997; Brinkman-Van der Linden *et al.*, 1996a; De Graaf *et al.*, 1993). sLe^x-structuren zijn belangrijke liganden voor de selectine familie van adhesiemoleculen (De Vries *et al.*, 1993) en kunnen voorkomen op elk van de 5 N-glycanen van humaan AGP (Dage *et al.*, 1998). Sialyl Lewis^x epitopen komen echter niet voor op muis AGP (of andere AFP's). Dit is het gevolg van de afwezigheid van α 3-fucosyltransferase in muis lever, tengevolge van een 'missense' mutatie in het *FUT6* gen, dat codeert voor α 3-fucosyltransferase (Brinkman-Van der Linden *et al.*, 1996b). Er kunnen wel fucose residu's voorkomen op muis AFP's, maar die worden heel waarschijnlijk aan de suikerketens vastgehecht via een α 6-binding (Havenaar *et al.*, 1998a). Bij patiënten die lijden aan lever cirrhose werden abnormaal hoge concentraties gedesialyleerd AGP gevonden, die correleerden met de graad van leverschade. Daarnaast is er ook een sterke verhoging in de fucosylatiegraad van het eiwit (3x meer dan bij 'normaal' AGP) (Biou *et al.*, 1984).

Aangezien een aantal biologische eigenschappen van AGP afhankelijk zijn van het soort suikerketens die op de molecule voorkomen (zie verder 1.3.8. α_1 -Acid Glycoprotein: inflammatory and immunomodulating properties), is het niet ondenkbaar dat het wijzigen van de suikerketens een middel is om bepaalde AGP glycovormen aan te maken die leiden tot functionele diversiteit (Treuheit *et al.*, 1992).

1.3.4.3. Regulatie van glycosylatiewijzigingen

Veranderingen in het glycosylatiepatroon van AGP zijn heel waarschijnlijk lever-gemedieerd, aangezien humane hepatocyten in staat zijn alle glycovormen van AGP te synthetiseren, die ook in normaal serum en dat van zieke patiënten teruggevonden worden (Van Dijk *et al.*, 1991). Het effect van cytokines (IL-1 β , IL-6, LIF, IFN γ) glucocorticoïden (dexamethasone), groeifactoren (TGF β), LPS of terpentijn op de distributie van de AGP-glycovormen, zoals ze gesecreteerd worden door hepatocyten en humane hepatoma cellijnen, toont aan dat deze moleculen, naast de reeds vermelde concentratieverandering, ook verantwoordelijk kunnen zijn voor de glycosylatieveranderingen die optreden tijdens inflammatie (Azuma *et al.*, 2000; Mackiewicz *et al.*, 1993; Pous *et al.*, 1992; Van Dijk *et al.*, 1991; Mackiewicz en Kushner, 1990; Mackiewicz *et al.*, 1987). Een bijdrage van extrahepatische cellen kan echter niet uitgesloten worden. De veranderingen in glycosylatiepatroon zijn heel waarschijnlijk het gevolg van het effect van cytokines en hormonen op de activiteit van verscheidene glycosyltransferasen. Vertakking van N-glycanen wordt gedeeltelijk gecontroleerd door verscheidene GlcNAc transferasen (GlcNAcTs). Er werd aangetoond dat IL-6 de activiteit van GlcNAcT-IV en GlcNAcT-V in humane myeloma cellen kan stimuleren. Het effect was een stijging in het aantal tri- en tetra-antennaire structuren op membraan gebonden glycoproteïnen (Nakao *et al.*, 1990). Veranderingen in fucosylatie en sialylatie zijn heel waarschijnlijk het gevolg van veranderingen in het expressieniveau van specifieke fucosyl- en sialyltransferasen (De Vries en Van den Eijnden, 1992).

1.3.5. AGP serum concentratie en microheterogeniteit als merker/diagnose middel

Verhoogde AGP serum concentraties of wijzigingen in AGP microheterogeniteit, treden vaak vroeger op dan de klinisch waarneembare kenmerken van bepaalde aandoeningen. AGP metingen worden dan ook vaak gebruikt als merker van de verschillende stadia van bepaalde ziektes, of om het verloop van de ziekte te voorspellen. Zo werd er een positief verband aangetoond tussen de AGP serum concentratie en de aanwezigheid van galstenen (Thijs *et al.*, 1999), ziekte activiteit en kans op 'relaps' bij de ziekte van Crohn (Kjeldsen *et al.*, 1997; Brynskov *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1987; Andre *et al.*, 1985), kans op relaps bij baarmoederkanker (Tosner *et al.*, 1988), e.a.

Wijzigingen in AGP microheterogeniteit, meer bepaald de graad van vertakking van de suikerketens, werden gecorreleerd met de ernst van asthma symptomen (Van Den Heuvel *et al.*, 2000). Rheumatoïde arthritis (RA) wordt gekenmerkt door een hogere vertakkings- én

fucosylatiegraad van de AGP suikerketens. Er zijn zelfs berichten over het voorkomen van een ongewone penta-gesialyleerde glycovorm tijdens RA (Havenaar *et al.*, 1998b; Eliot *et al.*, 1997; Mackiewicz *et al.*, 1987). Een lagere vertakkingsgraad daarentegen kan een indicator zijn voor een opflakking van de ziekte bij systemische lupus erythematosus patiënten (Mackiewicz *et al.*, 1987).

I.3.6. AGP receptoren en biologische relevantie van de interactie

In de literatuur is er slechts in één enkele publicatie sprake van een receptor die AGP via niet-lectine-interacties bindt. Deze komt voor op microvasculaire endotheelcellen van runder long (BLMVEC). Het gaat zelfs om 2 verschillende populaties van bindingsplaatsen: één die AGP met hoge affiniteit en lage capaciteit bindt en één die AGP met matige affiniteit en hoge capaciteit bindt. De binding is niet Ca^{2+} -afhankelijk, er treedt geen competitie op door carbohydraten (wat duidt op een niet-lectine-achtige interactie) en ze voldoet aan alle vereisten waaraan receptor-ligand interacties moeten voldoen: selectieve competitie, reversibiliteit, verzadiging en celtype-, ligandconcentratie- en tijdsafhankelijkheid. Er werd gesuggereerd dat AGP door binding op het endotheel een ladingsspecifieke barrière zou creëren, waardoor de negatieve lading van het endotheel zou verhogen en het transendotheliaal transport via electrostatische interacties zou beperkt worden (Schnitzer en Pinney, 1992). Deze receptoren zijn echter waarschijnlijk niet de enige die voorkomen op endotheelcellen. Predescu *et al.* (1998) hebben aangetoond dat transcytose van AGP plaatsvindt in het microvasculair endotheel van ondermeer myocardium, waardoor AGP naar de perivasculaire ruimte getransporteerd wordt. Bij de binding en mogelijks ook het transport van AGP waren drie eiwitten vereist met een MG lager dan 25 kDa (Predescu *et al.*, 1998).

In een recente publicatie werd beschreven dat AGP bindt op de chemokine receptor CCR5, geëxprimeerd op de plasma membraan van humane primaire macrofagen. Hitte denaturatie van het AGP kon de binding slechts gedeeltelijk (43%) inhiberen, wat suggereert dat er zowel eiwit-eiwit interacties als glycanen (die resistent zijn aan hitte denaturatie) bij de interactie betrokken zijn. De binding door AGP op CCR5 is een mogelijke verklaring voor het feit dat AGP de infectie inhijert van humane macrofagen door R5 HIV-1, dat CCR5 als co-receptor kan binden (Atemezem *et al.*, 2001).

Daarnaast werden ook receptoren gevonden die AGP enkel via lectine-achtige interacties (en dus aspecifiek) binden. Deze komen ondermeer voor tijdens de overgang tussen twee stadia in de spermatogene cyclus in het cytoplasma van spermatocyten, jonge spermatiden en Sertoli cellen. De receptor verdwijnt in het late stadium van de spermatiden (Andersen *et al.*, 1996). In rat prostaat en seminale vesikels werd eveneens dergelijke lectine-achtige receptor gevonden (Andersen *et al.*, 1996). In beide gevallen is de lectine-achtige receptor specifiek voor een of meerdere (maar niet alle) ConA AGP-varianten. Ook monocyt en

macrofagen bezitten dergelijke receptor. Deze bindt enkel AGP-C en resulteert in endocytose en afbraak van het AGP (Carpentier *et al.*, 1993)

I.3.7. AGP als drug bindend eiwit

Wegens zijn sterk negatieve lading is AGP in staat verscheidene positief geladen drugs te binden, maar ook lipofiele drugs (endo- en exogene) kunnen door AGP gebonden worden. Door die binding kan de farmacologische activiteit en weefseldistributie van de drug beïnvloed worden, vooral tijdens inflammatoire condities, wanneer de AGP concentratie verhoogd is. Bepaalde drugs vertonen ook species-specifieke AGP binding of selectieve binding op een van de AGP varianten binnen een bepaald species. Er werden twee afzonderlijke drug bindingsplaatsen op humaan AGP gekarakteriseerd (Herve *et al.*, 1996). Hieronder worden enkele voorbeelden gegeven van drug binding door AGP en de mogelijke gevolgen ervan:

1/ Chronische myeloïde leukemie wordt veroorzaakt door een chromosomale translocatie, die resulteert in een oncogenisch fusie eiwit, Bcr-Abl met tyrosine kinase activiteit. De tyrosine kinase activiteit van dit fusie eiwit kan geïnhibeerd worden door de antineoplastische drug STI571, dewelke ook muizen kan genezen die een injectie gekregen hebben met humane leukemie-cellen. Wanneer de muizen al te grote tumoren hebben, helpt de drug-behandeling echter niet. De reden daarvoor is dat AGP de drug STI571 bindt, waardoor de tyrosine kinase inhiberende activiteit van de drug verhinderd wordt, en dat de AGP plasma concentratie sterk geassocieerd was met tumor grootte (Gambacorti-Passerini *et al.*, 2000).

2/ Er worden verschillende humaan immuundeficiënt virus (HIV) protease inhibitoren (PI) gebruikt om HIV te bestrijden. AGP binding op deze drugs kan leiden tot inactiviteit van de drug, afhankelijk van het soort drug en de concentratie AGP (Zhang *et al.*, 1999).

3/ De drug UCN-01 is een proteïne kinase inhibitor die antitumor activiteit vertoont. Tijdens fase I klinische trials bleek de plasma concentratie van deze drug veel hoger dan verwacht. Dit werd verklaard door een species specifieke binding van UCN-01 met humaan AGP en in veel mindere mate met rat AGP (de drug werd namelijk oorspronkelijk getest in ratten) (Fuse *et al.*, 1999; 1998).

4/ Bepaalde drugs binden specifiek een bepaalde humane AGP variant. Drugs die voornamelijk op de ORM2 variant binden zullen minder gemakkelijk de hersenen bereiken (Jolliet *et al.*, 1998).

In de volgende tabel zijn een aantal drugs weergegeven die door AGP gebonden worden (tabel I.4).

DRUGS DIE DOOR AGP GEBONDEN WORDEN			
Categorie	Drug	Categorie (vervolg)	Drug (vervolg)
Alfa-blokker	Nicergoline	Fluorescente probe	DAPN, derivaat van propranolol
	Prazosin		1,8-Anilino-naphtalene sulfonate
Anestheticum/Analgeticum	Alfentanil	Neuromusculaire blokker	Metocurine
	Ketamine		d-Tubocurarine
Anestheticum	Bupivacaine	Oestrogeen	Progesterone
	Etidocaine		Cortexone
	Phencyclidine		Cortisol
Analgeticum	Fentanil	Psychotropicum	Testosterone
	Meperidine		Estradiol
	Methadone		Amitriptyline
	Phenylbutazon		Chlorpromazine
Anestheticum/Antiarrhythmicum	Lidocaine		Cyclazindol
			Desmethylinipramine
Antiarrhythmicum	Asprindine		Diazepam
	Disopyramide		Doxepin
	Quinidine		Fluphenazine
	Verapamil		Haloperidol/Imipramine
			Loxapine
Antibioticum	Erythromycine		Mianserine
			Nortriptyline
Anticoagulans	Acenocoumarol		Norzimelidine
	Dipyridamole		Perazine
	PCR 2362, thienopyridin derivaat		Perphenazine
	Ticlopidine		Phenobarbital
	Warfarine		Phenothiazine derivaten
			Promazine
Antiepilepticum	Carbamazepine		Acepromazine
	Phenytoin		Protipendyl
Anti-inflammatoir agens	Naproxen		Thioridazine
			Thiothixene
			Triazolam
			Trifluoperazine
Beta-blokker	Alprenolol	Vitamine	Zimelidine
	Metoprolol		Vitamine B12
	Oxprenolol		
	Pindolol en 8 verwante bestanddelen		
	Propranolol		
	Timolol		

Tabel I.4: Drugs die door AGP gebonden worden (Kremer *et al.*, 1988).

REVIEW

I.3.8. α_1 -Acid Glycoprotein: inflammatory and immunomodulating properties

Hochepped, T., Brouckaert, P., and Libert, C.

Submitted for publication

Alpha₁-acid glycoprotein (AGP) is a protein with a molecular weight of 41-43 kDa. It is heavily glycosylated (45 %). Due to the presence of sialic acids, it is very negatively charged (pI = 2.7-3.2). AGP is an acute phase protein in all mammals investigated to date. The serum concentration of AGP rises several fold during an acute phase response, the systemic answer to a local inflammatory stimulus. Also its glycosylation pattern can change depending on the type of inflammation. The biological function of this protein is not clear. A number of activities on different types of blood cells *in vitro* have been described. *In vivo*, AGP seems to have a protective effect in several models of inflammation.

Introduction

α_1 -Acid Glycoprotein (AGP), also called orosomucoid, is a heavily glycosylated (45 %) serum protein (Schmid *et al.*, 1977). Five N-glycans are attached to the human protein (Yoshima *et al.*, 1981). It is also very negatively charged (pI = 2.7-3.2) due to the presence of sialic acids (12 % of the carbohydrate moiety). AGP is an acute phase protein which is synthesized mainly by hepatocytes, but extrahepatic synthesis also has been reported (for a review, see Fournier *et al.*, 2000). The serum concentration of AGP rises 2-5 times during an acute phase response. Its glycosylation pattern can also change depending on the type of inflammation (De Graaf *et al.*, 1993; Turner, 1992; Mackiewicz *et al.*, 1987). Depending on ConA reactivity, AGP can be fractionated into ConA non-reactive (AGP-A), weakly reactive (AGP-B) and strongly reactive (AGP-C). The synthesis and glycosylation of AGP are regulated independently (van Dijk *et al.*, 1995; van Dijk *et al.*, 1994) both by cytokines (IL-1, IL-6, TNF) and glucocorticoids (Azuma *et al.*, 2000; Mackiewicz *et al.*, 1993; Pous *et al.*, 1992; Van Dijk *et al.*, 1991; Mackiewicz and Kushner, 1990; Mackiewicz *et al.*, 1987). The biological function of this protein is not clear, although a number of activities *in vitro* as well as *in vivo* have been described. AGP has the ability to bind and transport several basic and neutral drugs from endogenous and exogenous origin (for a review, see Kremer *et al.*, 1988). AGP has also been classified as a member of the immunocalin family, a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses (Lögberg and Wester, 2000).

In this review we will focus on the immunomodulatory effect as well as on the pro- and anti-inflammatory properties of AGP and the possible biological implications. We will also discuss the cytokine inducing effect on monocytes and macrophages and a number of, mostly anti-inflammatory, *in vivo* activities of AGP.

Immunomodulating effects of AGP

Human AGP was found to markedly inhibit the proliferative response of human peripheral blood lymphocytes to phytohemagglutinin (PHA). The inhibitory effect of AGP was both at the level of the lymphocyte and at the level of the mitogen and was reversible. AGP also inhibited blastogenesis induced by Concanavalin A (ConA) and pokeweed mitogen (PWM), although to a lesser extent. The inhibitory effect of AGP was directed mainly against T-cells and not B-cells, since formation of E-rosettes (T-cells) but not of EAC-rosettes (B-cells) was inhibited, and since the responding but not the stimulating cells in the mixed lymphocyte reaction (MLR) were inhibited by AGP. The inhibitory effect of AGP in the MLR was probably directed against a subset of T-cells, since 100% inhibition could not be achieved (Chiu *et al.*, 1977). It was suggested that the effect of AGP could be due to an interaction with and possible alteration of the lymphocyte surface or by modulating intracellular factors or pathways, like protein tyrosine kinase (PTK) (Wu *et al.*, 1999), known to be associated with the proliferative response of these cells. An interaction with the lymphoid membrane was indeed demonstrated by Cheresch *et al.* They showed that AGP, but not its asialo-derivative was able to displace an anionic surface probe from synthetic phosphatidyl choline vesicles (Cheresch *et al.*,

1984). They speculated that AGP might alter lymphocyte membrane fluidity and receptor capping at the level of membrane bound phospholipase (Blackwell *et al.*, 1982) or membrane glycosyl-transferase (Lee and Kim, 1979). Elg *et al.* showed that inhibition of lymphocyte proliferation by AGP correlated with a decrease in IL-2 synthesis by the lymphocytes (Elg *et al.*, 1997). Comparable observations were made by others who showed that AGP suppressed lymphocyte mitogenic response to LPS and alloantigens, the induction of cell-mediated lympholysis against allogenic target cells and the antibody response of B-cells to sheep erythrocytes. The latter indicates that AGP is not only suppressive for T-cell function. Moreover, different glycan-variants of AGP showed different degrees of inhibition (Bennet and Schmid, 1980). This was also demonstrated by other investigators who showed that AGP-A was the strongest inhibitor of anti-CD3 stimulated lymphocyte proliferation (Pos *et al.*, 1990), but on the other hand low concentrations of AGP-A were also shown to be responsible for the stimulation of mononuclear cell proliferation; this stimulation was much greater in T-cells than in B-cells and monocytes (Pos *et al.*, 1990; Singh and Fudenberg, 1986/1987). It seems that the effect of AGP on lymphocyte proliferation depends on the type of mitogen, the glycan form of AGP and the concentration used. A Russian team confirmed the importance of the carbohydrate moiety of AGP by conjugating the glycan chains of AGP to a synthetic carrier in such a way that the molecular weight and glycan composition of the synthetic matrix imitated that of native AGP. They showed that this synthetic matrix had the same inhibitory effect as native AGP on the proliferation of lymphocytes, indicating that this activity is mediated exclusively by the glycans on the AGP molecule and that the polypeptide chain of AGP did not play a major role (Shiyan *et al.*, 1994). All these experiments required doses of AGP that were in the range of normal or inflamed serum levels (< 3 mg/ml). It has been hypothesized that this nonspecific immunosuppressive activity of AGP can be a major problem in patients with cancer, impairing immune defenses against the tumor, resulting in immune escape of the tumor, thwarting attempts at immunotherapy, and predisposing the patient to infection (Elg *et al.*, 1997; Samak *et al.*, 1982; Tamura *et al.*, 1981). In contrast, AGP has also been shown to inhibit growth of several types of tumor cells *in vitro* (Watanabe *et al.*, 1987).

***In vitro* pro- and anti-inflammatory effects of AGP**

Effect on neutrophils

Neutrophils are among the first cells to accumulate at the site of an infection or injury. Once migrated through the subendothelial spaces, they are attracted to the site of infection by chemoattractant cytokines. Activated neutrophils phagocytose microorganisms or release cytotoxic compounds (e.g. reactive oxygen species and proteases) in the extracellular environment.

AGP has been shown to inhibit several activities of neutrophils. It inhibits neutrophil chemotaxis to the chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) without affecting spontaneous migration, in concentrations in the range of that observed in normal or inflamed serum (< 2 mg/ml). At low doses (0.3 mg/ml), AGP exerts an aggregating effect on neutrophils but at higher doses (> 0.5 mg/ml) it inhibits aggregation (Lainé *et al.*, 1990; Costello *et al.*, 1984). It also inhibits superoxide generation by neutrophils stimulated either by opsonized zymozan (OZ) or phorbol myristate acetate (PMA). The inhibitory effect is dose dependent and inversely proportional to the concentration of the stimulus. The observation that the effect was similar after fMLP, PMA or OZ suggests that AGP acts at the level of the neutrophil membranes. It was suggested that interference of specific receptors linked to various G proteins or non-specific trapping in the lipid bilayer might be involved (Dirienzo *et al.*, 1987). On the other hand, since AGP strongly inhibits PMA-induced PMN activation, a direct interaction with protein kinase C (PKC) could also be involved. Costello *et al.* have described a transient inhibition, by AGP, of zymozan-primed serum-, PMA-, or fMLP-induced superoxide production by neutrophils. However, this effect was completely reversible within 2 min of incubation and might reflect cellular adaptation involving functional and receptor recovery (Costello *et al.*, 1984). However, OZ-stimulated superoxide generation could not be inhibited by more than 50%, in contrast to fMLP stimulation, suggesting a mechanism other than membrane activation could be involved in this inhibiting effect (Lainé *et al.*, 1990). This is confirmed by the observation that inhibition of superoxide generation by OZ but not by PMA was dependent on AGP glycan structures. The inhibitory effect decreased with ConA non-reactivity. Inhibition of the chemotactic response to fMLP or to C5a on the contrary, increased with ConA non-reactive variant (Vasson *et al.*, 1994). AGP might protect *in vivo* against PMN activation, by inhibiting both membrane

activation and calmodulin-dependent kinase (Heyworth and Segal, 1986).

Effect of AGP on platelets

Subsequent to vascular damage, platelet adherence occurs on the subendothelial collagen, thereby getting triggered to release ADP, serotonin and thromboxane A₂. These strong recruiting agents on their turn activate additional platelets resulting in aggregation on the initial layer of adherent platelets. Phospholipids on the platelet surface are then available for catalytic activation of proteins of the coagulation system, resulting in thrombin formation, which strongly induces further platelet activation, release and recruitment, as well as fibrin formation (Marcus, 1999).

AGP was shown to inhibit platelet aggregation induced by ADP or epinephrine in a dose dependent manner. The AGP concentrations needed to obtain this effect were quite high (1.25 - 7.5 mg/ml) (Snyder and Coodley, 1976). Inhibition of platelet aggregation was also observed by Costello *et al.* They showed that also thrombin-induced platelet aggregation could be inhibited by AGP. The AGP concentration they used however, was in the range of that found in inflamed serum (2 mg/ml). Moreover, when AGP was desialylated, they observed an increase in inhibitory effect (Costello *et al.*, 1979). The opposite effect was shown by Andersen and Eika (1980), who showed that inhibition of thrombin-induced platelet aggregation was much reduced after desialylation of AGP. They had no explanation for this opposite effect, except the fact that they had purified AGP from a different source and that they had used a different sialyase. The AGP they used was purified from pooled normal human plasma, compared to Costello *et al.* who had purified the AGP from human pleural fluids. However, since glycosylation is changed during inflammatory conditions, the opposite effects could be due to different carbohydrate compositions on the AGP molecules used. They also showed that AGP counteracted the inhibition of platelet aggregation by heparin + antithrombin-III (AT-III). This was probably due to steric hindrance of the heparin-thrombin interaction (Andersen and Godal, 1979). Epinephrine- and collagen- induced platelet aggregation were also inhibited by AGP, but fairly high concentrations were needed to obtain this effect (10 mg/ml). Since AGP has been reported to interact with collagen (Franzblau *et al.*, 1976), it cannot be excluded that AGP, in collagen-induced platelet aggregation, interacts with both the collagen fibers and the platelet membrane (Andersen and Eika, 1980).

In all cases, inhibition of platelet aggregation was directed preferentially against the secondary wave of platelet aggregation and subsequently as an inhibitor of the release reaction. This indicates that AGP possibly contributes to the downregulation of the further recruitment of platelets. This function is shared with polymorphonuclear leukocytes which are in close contact with platelets, serving an antithrombotic function in inhibiting further platelet activation and recruitment (Valles *et al.*, 1993). In this viewpoint, the local production of AGP by these leukocytes (Gahmberg and Andersson, 1978) might be one of the mechanisms by which the leukocytes exert their antithrombotic function.

Cytokine-induction by AGP

AGP is able to induce or to stimulate secretion of several cytokines by mononuclear cells. Human AGP has been shown to induce the secretion of an inhibitor of IL-1 activity, when introduced in culture medium of mouse peritoneal macrophages. Again, different AGP glycoforms had a differential effect, with ConA unreactive AGP being more effective than ConA reactive AGP (Bories *et al.*, 1987). Desialylation of AGP did not show any difference in effect (Bories *et al.*, 1990). A stimulatory effect of AGP on the production of IL-1 by human monocytes was shown (Singh and Fudenberg, 1987). The opposite has also been shown: monocytes stimulated by inflammatory cytokines produce AGP, thereby leading to a higher concentration of AGP in inflammatory areas. In this way AGP does not only act systemically but also locally (in an immunosuppressive manner) (Nakamura *et al.*, 1993) and creates a positive feedback loop for the local production of IL-1. In contrast to previous findings of this group making use of murine peritoneal macrophages exposed to human AGP (described here above), they found that human PBM, peritoneal and alveolar macrophages did not secrete IL-1 inhibiting activity in the culture supernatans (Bories *et al.*, 1990). The discrepancy of the results obtained with murine and human macrophages was explained by them as being related to species specificity of human AGP. However, the results obtained by Tilg *et al.* showed that this was not the case. They showed that human AGP induced the secretion of IL-1Ra (which is most probably the factor with IL-1 inhibiting activity that was found previously (Bories *et al.*, 1990; Bories *et al.*, 1987)) and to a lesser extent IL-1 β , by human PBM. AGP was synergistic with low concentrations of LPS in the induction of both IL-1Ra and IL-1 β synthesis (Tilg *et al.*, 1993). AGP also induced monocytes to express other pro- and anti-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-

12 and soluble TNF receptor (Tilg *et al.*, 1993). Boutten *et al.* showed that AGP potentiated the effect of suboptimal concentrations of LPS or muramyl dipeptide in inducing IL-1 β , IL-6 and TNF secretion by human peripheral blood monocytes (PBM), peritoneal and alveolar macrophages. In the absence of LPS, AGP also had an, albeit lower, effect on cytokine secretion, and preincubation of monocytes with AGP, before removal of AGP and addition of LPS, had a comparable effect as coincubation with both LPS and AGP (Boutten *et al.*, 1992). AGP-induced tissue factor (TF)- and TNF-expression by human monocytes was reported by Su *et al.* and depended on *de novo* mRNA synthesis (Su *et al.*, 1996). Moreover, TNF-induced secretion by monocytes was enhanced in the presence of AGP binding proteins, such as C3 and IgG. sCD14 was also shown to bind AGP, but its potentiating effect on AGP induced secretion of TNF was not tested. Since CD14 and receptors for C3 and IgG are expressed on the surface of monocytes, it is possible that binding of these proteins may enhance AGP binding ability to monocytes and therefore potentiate its effect. A similar effect was shown for streptococcal rhamnose glucose polymers that also can bind to sCD14, C3 and IgG and induce human monocytes to release TNF (Soel *et al.*, 1995). Finally, TNF secretion induced by AGP was inhibited in the presence of protein tyrosine kinase (PTK) inhibitors, suggesting that tyrosine kinase signaling is involved (Su *et al.*, 1999). Finally, AGP is also able to suppress TNF secretion by human PBM, stimulated with LPS and IFN γ simultaneously, but without inhibiting biological activity of the released

cytokine. The suppressive effect of AGP is thus possibly confined to the inhibition of the TNF α converting enzyme (TACE) or an as yet unidentified enzyme with comparable activities. The stimulating activity of AGP on cytokine secretion probably contributes to the local effect of AGP in the inflammatory response. An effect which can be enforced by the local production of AGP by monocytes in response of some of these cytokines. The fact that pro- as well as anti-inflammatory cytokines are induced confirms the fact that the inflammatory process is controlled by a delicate balance among cytokines with antagonistic functions. The synergistic effect on stimulation of pro-inflammatory cytokines thereby has an amplifying effect on the inflammatory response, whereas in the absence of LPS, there is a tendency to a down-modulating effect of the inflammatory response.

Effect of AGP on wound healing

Some effects of AGP may suggest a beneficial role in wound healing. AGP has been shown to stimulate fibroblast proliferation (Maeda *et al.*, 1980a), to possess nerve growth promoting activity (Liu *et al.*, 1988) and to interact with collagen, inducing the formation of fibrous long spacing fibers (Franzblau *et al.*, 1976). All these activities of AGP may accelerate the process of wound healing.

The *in vitro* data show that AGP has both pro- and anti-inflammatory effects. These dual immunomodulatory effects may indicate that AGP plays an important role in the regulation of immune response and inflammation (Figure 1).

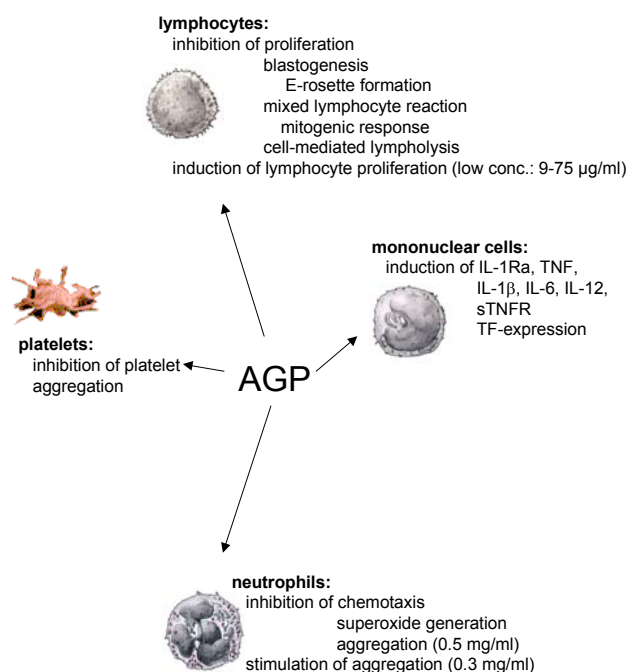


Figure 1: Overview of effects of AGP on lymphocytes, platelets, mononuclear cells and neutrophils.

In vivo effects of AGP

AGP is able to protect mice from lethal shock induced by TNF, which is considered to be an important mediator of shock-inducing activities of LPS (Libert *et al.*, 1994). However, AGP was not able to protect rats or mice against LPS-induced lethality (Muchitsch *et al.*, 1998). TNF may thus be a major mediator in LPS-induced lethality, but not a critical one, since TNF-deficient or TNFR1-deficient mice are also not protected against LPS-induced

lethality (Marino *et al.*, 1997; Rothe *et al.*, 1995). Friedman made the interesting proposal that AGP is a non-specific anti-infectious agent (Friedman, 1983). This function could be performed because the mature glycoprotein, whose content in sialic acid is particularly high, resembles a typical sialomembrane protein; it could therefore function as a non-specific competitor for cell surfaces, blocking the binding and the invasion of infective agents. Such interaction has been suggested by Friedman who showed that AGP inhibits the ability of *Plasmodium falciparum* to infect red blood cells, while Maeda *et al.* showed that the resistance of red blood cells to hemolysis in the presence of AGP was increased (Maeda *et al.*, 1980b). On the other hand, AGP can also inhibit the attachment and subsequent internalization of *Mycoplasma pneumoniae* by human alveolar macrophages (Athamna *et al.*, 1996), thus acting as an inhibitor of phagocytosis.

We have shown that AGP is involved in the induction of nonspecific resistance to infection. In a bacterial model of septic shock, using the Gram-negative *K. pneumoniae*, we observed protection by AGP when it was given prior to the lethal challenge. This protection was clearly at the level of bacterial spreading or clearance, since mice treated with AGP showed much less bacteria in their blood and in different organs. A possible explanation is the effect of AGP on capillary permeability, which controls transport of molecules through the endothelium. As such, bacteria may be prevented from entering the blood stream and spread to different organs. Moreover, not only exogenous administered AGP could protect, but transgenic mice, overexpressing rat AGP were also shown to be protected against a lethal challenge with *K. pneumoniae* and also showed less bacteria in their blood and organs (Hochepped *et al.*, 2000). Protection by AGP was also observed in rats with septic peritonitis, when the AGP was given 15 min prior to and 24h after cecal puncture, and in a model of hemorrhagic/hypovolemic shock. In the latter model, resuscitation with AGP resulted in significantly higher values of mean arterial blood pressure, cardiac output and stroke volume (Muchtisch *et al.*, 1998). The authors concluded that the protection observed by AGP in this model and in the model of septic peritonitis was due to induction of an increased capillary barrier by AGP, maintaining perfusion of vital organs. The effect of AGP on capillary permeability had been demonstrated earlier by this group. They had shown that in guinea-pigs, AGP antagonized the capillary leakage induced by several agonists of vascular permeability, like lysplasminogen, histamine, platelet-activating factor, thrombin and bradykinin (Muchtisch *et al.*,

1996). The cellular response of endothelial cells to AGP is rapid and can be reduced by pretreatment with a soluble cAMP analog (8-bromo-cAMP), indicating receptor activation and subsequent use of cAMP as a second messenger (Sörensson *et al.*, 2000). The finding that AGP induces a cAMP-dependent signal in the endothelial cells supports the findings made by Schnitzer and Pinney (1992) of receptor-like binding sites in bovine lung microvascular endothelial cells. Moreover, AGP was shown to have a direct anti-inflammatory effect on endothelial cells, which have been reported to produce AGP themselves (Sörensson *et al.*, 1999), since pretreatment with AGP markedly attenuated the metabolic response, ultimately leading to contraction of the cells, to histamine (Sörensson *et al.*, 2000). cAMP indeed has an effect on increased basal permeability of certain capillaries as has been described in chorioallantoic membranes of chick embryos (DeFouw and DeFouw, 1999), in cultured endothelial cell populations (van Hinsbergh *et al.*, 1997), and in intact microvessels of frog mesentery (Adamson *et al.*, 1998).

Libert *et al.* also showed that AGP protected against inflammatory hepatitis induced by TNF and galactosamine (GalN) and LPS and GalN. AGP significantly protected against the enhanced plasma clotting time, the release of liver transaminases, the reduction in body temperature and mortality when given at least 2h before the lethal challenge, and the concentration that was used resembled that in inflamed conditions (Libert *et al.*, 1994). The protection observed by AGP was demonstrated not to be by scavenging platelet activating factor (PAF), a mediator of TNF/GalN induced lethality which was shown to be able to bind to AGP (McNamara *et al.*, 1986), since AGP could not protect against PAF-induced lethality (Libert *et al.*, 1995). Protection of AGP against LPS/GalN was also observed by Moore *et al.* They showed that AGP could directly interact with LPS and that AGP-LPS complexes could activate a mouse macrophage cell line (P388.D1), resulting in phagocytosis of the AGP-LPS complexes. Activation was not noted with AGP or LPS alone. They argued that *in vivo*, AGP in the plasma and in interstitial spaces would bind LPS, resulting in AGP-LPS complexes that function by neutralizing the direct toxicity of LPS and enhance clearance of LPS from the body (Moore *et al.*, 1997). It was also demonstrated that AGP could protect against inflammatory hepatitis induced by TNF and actinomycine D (ActD) and that AGP specifically inhibited apoptosis of hepatocytes after TNF/GalN or TNF/ActD challenge (Van Molle *et al.*, 1997). The protection observed was specific for TNF,

since AGP could not protect against inflammatory hepatitis induced by anti-Fas. However, protection was not due to a nonselective inhibition of the TNF-activated pathways, since induction of IL-6, nitric oxide, or serum amyloid P was not inhibited. Moreover, the protection observed by AGP was probably indirect, since it did not confer protection against TNF/ActD induced apoptosis in the hepatoma cell lines HepG2 and BWTG3. The protection against apoptosis of hepatocytes by AGP later on proved to be the result of an inhibition of the activation of the major executioner caspases-3 and -7 (Van Molle *et al.*, 1999). Transgenic mice overexpressing rat AGP were also not protected against inflammatory hepatitis induced by TNF/GalN, LPS/GalN, TNF/ActD or anti-Fas, although exogenous administered AGP still could protect in these mice and AGP purified from these transgenic mice also was protective (Libert *et al.*, 1998; Hochepeid, unpublished results). This suggests that rapid induction of serum levels is required for the protective response, which occurs during an acute phase reaction, or after injection of AGP. Possibly, the high constitutive levels of AGP in the transgenic mice may be produced in concert with an AGP-binding factor that inhibits the protective biological activity of AGP and that also would be present in high concentrations in the transgenic mice, but not in the AGP purified from these transgenic mice. Another explanation is that the protective effect has something to do with the glycosylation of AGP. The transgenic mice produce high levels of AGP in non-inflammatory conditions. The glycosylation pattern of this transgenic AGP (strongly ConA reactive) is possibly not protective. The purified AGP from these mice is however protective, but this is possibly due to the fact that the mice are injected with turpentine before the purification of AGP from the serum. This causes an acute phase reaction, whereby the concentration of AGP in the serum is increased, but whereby also glycosylation is changed, resulting in a shift toward moderately ConA-reactive forms (Mackiewicz *et al.*, 1991).

AGP was shown to inhibit apoptosis and inflammation after 45 minutes of renal I/R in a murine model. AGP administered at reperfusion prevented early (2-hour) and late (24-hour) apoptosis (Daemen *et al.*, 2000). Late apoptosis is mediated by increased TNF expression. It was already demonstrated that AGP could inhibit TNF-mediated apoptosis of hepatocytes in GalN or ActD-sensitized mice (Van Molle *et al.*, 1999; Van Molle *et al.*, 1997). However, early apoptosis is inflammation-independent, which indicates that the antiapoptotic potential of AGP

is not limited to TNF-induced apoptosis. A direct inhibition of caspases is however not the case (Libert, unpublished results). AGP also exerted anti-inflammatory effects, as reflected by reduced renal TNF expression and neutrophil influx after 24 hours. The latter effect could be due to Sle^x structures on the AGP molecule inhibiting the interaction between neutrophils and endothelium (Brinkman-van der Linden *et al.*, 1998). Renal function in general, was improved by AGP. Similar effects were observed when AGP was administered 2h after reperfusion but to a lesser extent and without functional improvement (Daemen *et al.*, 2000). AGP is also needed for the maintenance of glomerular permselectivity as shown in isolated rat kidneys (Johnsson *et al.*, 1993; Haraldsson *et al.*, 1992). This can also add to the positive effect of AGP seen after reperfusion and, in part, explain why renal function is not improved when AGP is given only 2 hours after reperfusion. On the contrary, transgenic mice, continuously expressing high levels of AGP in the circulation, were not protected against renal ischemia/reperfusion (B. de Vries, unpublished results). This could indicate that Sle^x structures play an important role in the protection against I/R, since mice don't have a functional α 3 fucosyltransferase, necessary for generating Sle^x-structures (Brinkman-Van der Linden *et al.*, 1996). Indeed, in a model of gut ischemia/reperfusion, local intestinal injury was reduced in animals treated with Sle^x-bearing AGP (sAGP) but not with non-sAGP (nsAGP). sAGP treated animals also had a reduction in remote lung injury and a reduction in pulmonary MPO levels after 50 minutes of ischemia, 4h after reperfusion (Williams *et al.*, 1997). The fact that nsAGP failed to ameliorate the pulmonary injury indicates that Sle^x is required for sAGP action. It was speculated that the interaction of Sle^x moieties on sAGP with functional lectin domain of selectins on lung endothelium reduces the interaction between neutrophils and endothelium, thereby limiting their rolling and sequestration and leading to a reduction in neutrophil-dependent injury, which indeed has been shown to be the case (Brinkman-van der Linden *et al.*, 1998). The reduction in local intestinal injury was correlated with a paradoxically increased level of MPO in the gut. However, in this model, neutrophils don't play a prominent role in local injury (Simpson *et al.*, 1993). Local injury is almost entirely mediated by deposition of complement (Hill *et al.*, 1992). It was shown that sAGP could inhibit activation of the alternative complement pathway *in vitro* (Williams *et al.*, 1997). Again, the degree of sialylation is important for this activity of AGP. Indeed, it was shown by Meri and Pangburn that

sialic acid bearing polyanions inhibit the alternative pathway of complement by enhancing binding of complement C3b to factor H (Meri and Pangburn, 1990). The finding that AGP can bind with C3 may be in favour of the latter observation (Su *et al.*, 1999).

Thus, it seems that Sle^x structures can play an important role in the protection against damage after ischemia/reperfusion. The relevance of this can be questioned, since mice do not express the *FUT6* gene, implicating that Sle^x-structures are not present in the mouse in physiological conditions. However, the fact that Sle^x structures do play an important role in mice argues for an even more important role for the Sle^x-interaction in other species, where these ligands make part of the glycan structures, especially in inflammatory conditions. But this also implicates that there are alternative ways to prevent damage induced by ischemia/reperfusion.

Rats with induced nephrotic syndrome showed a decrease in triglyceride clearance. The injection of AGP restored the lipid clearance to normal. This was explained by the fact that AGP was shown to be a cofactor in the lipoprotein lipase reaction. AGP increased lipolysis 100% in the presence of C-II apolipoprotein in a lipoprotein lipase assay system (Staprans and Felts, 1977). In cerulein-elicited edematous pancreatitis AGP improved histological alterations and plasma amylase activity. Edema and plasma lipase were not affected in a biologically relevant manner. In glycodeoxycholic acid-induced hemorrhagic-necrotizing pancreatitis AGP was without effect on parameters measured (plasma amylase, plasma lipase activity, histological scores). At extremely high doses of AGP however, plasma amylase and lipase levels were decreased. In LPS-mediated ARDS, AGP but also placebo formation decreased MPO content in the bronchoalveolar lavage fluid. Histological alterations were also improved by AGP, however, not by the placebo formation. Lung water content was not significantly influenced by AGP, whereas Evans blue extravasation was significantly diminished (Muchitsch *et al.*, 2000).

Finally, injection of monosodium urate crystals, with AGP, into the footpads of rats also showed an antiinflammatory action of AGP. However, the amount of AGP that was needed to obtain this anti-inflammatory effect was far above normal or even inflamed concentrations (Denko and Wanek, 1984).

Conclusion

The effects of AGP reviewed here contribute to the general function of the acute fase response as a coordinated system that modulates host

immune responses during periods of intense inflammation and tissue destruction. The downmodulating effect of neutrophil function, probably is one way to downregulate the local inflammatory response and to prevent ongoing tissue damage caused by neutrophil proteases and ROS species. The inhibitory effect on platelet aggregation can have a similar purpose. AGP can downmodulate platelet aggregation and thus further platelet recruitment, following the release reaction which is also inhibited. The presence of leukocytes can thereby add to the local AGP concentration at the site of injury, creating an amplification loop. The net effect on the stimulation of pro- and anti-inflammatory cytokine-production is hard to predict, since even at the site of inflammation, there is a delicate balance between these types of cytokines. It is possible that AGP acts as some kind of feedback system, since cytokines as IL-1 and TNF can stimulate AGP production by leukocytes, which in turn can be stimulated by AGP to release IL-1 and TNF together with their natural antagonists, acting to control the feedback system.

These anti-inflammatory effects of AGP can all contribute to the protective effects of AGP, seen *in vivo*, where the composition of the glycan chains and the presence of Sle^x-structures can fine tune the AGP-activities. An additional feature of AGP which can contribute significantly to its *in vivo* effect is the interaction with the endothelium, controlling permselectivity. This property can have a dramatic influence during shock. AGP can delay the extravasation caused by agonists like PAF, thereby preserving normal organ perfusion and fuction. If this delay is sufficient enough for anti-inflammatory cytokines and other mediators to control the inflammatory response, lethality can be prevented.

References

- Adamson, R. H., Liu, B., Nilson Fry, G., Rubin, L. L., and Curry, F. E. (1998) Microvascular permeability and number of tight junctions are modulated by cAMP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 274:H1885-H1894
- Andersen, P., and Godal, K. C. (1979) The antiheparin effect of α_1 -acid glycoprotein probably due to steric hindrance of the heparin-thrombin interaction. *Thromb Res* 15:857-868
- Andersen, P., and Eika, C. (1980) Thrombin-, epinephrine- and collagen-induced platelet aggregation inhibited by α_1 -acid glycoprotein. . *Scand J Haematol* 24:365-372

- Athamna, A., Kramer, M. R., and Kahane, I. (1996) Adherence of *Mycoplasma pneumoniae* to human alveolar macrophages. *TEMS Immunol Med Microbiol* 15:135-141
- Azuma, Y., Murata, M., and Matsumoto, K. (2000) Alteration of sugar chains on alpha(1)-acid glycoprotein secreted following cytokine stimulation of HuH-7 cells in vitro. *Clin Chim Acta* 294:93-103
- Barclay, G. R., Flewett, T. H., and Keller, E. (1969) Effect of polymerized orosomucoid on some strains of influenza virus. *Biochem J* 111:353-357
- Bennet, M., and Schmid, K. (1980) Immunosuppression by human plasma α_1 -acid glycoprotein: importance of the carbohydrate moiety. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6109-6113
- Blackwell, G. J., Carnuccio, R., Di Rosa, M., Flower, R. J., Langham, C. S. J., Parente, L., Persico, P., Russel-Smith, N. C., and Stone, D. (1982) Glucocorticoids induce the formation and release of anti-inflammatory and anti-phospholipase proteins into the peritoneal cavity of the rat. *Br J Pharmacol* 76:185-189
- Bories, P. N., Guenounou, M., Féger, J., Kodari, E., Agneray, J. and Durand, G. (1987) Human α_1 -acid glycoprotein-exposed macrophages release interleukin 1 inhibitory activity. *Biochem Biophys Res Commun* 147:710-715
- Bories, P. N., Feger, J., Benbernou, N., Rouzeau, J.-D., Agneray, J., and Durand, G. (1990) Prevalence of tri- and tetraantennary glycans of human α_1 -acid glycoprotein in release of macrophage inhibitor of interleukin-1 activity. *Inflammation* 14:315-323
- Boutten, A., Dehoux, M., Deschenes, M., Rouzeau, J.-D., Bories, P. N., and Durand, G. (1992) α_1 -Acid glycoprotein potentiates lipopolysaccharide-induced secretion of interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor- α by human monocytes and alveolar and peritoneal macrophages. *Eur J Immunol* 22:2687-2695
- Brinkman-Van der Linden, E. C., Mollicone, R., Oriol, R., Larson, G., Van den Eijnden, D. H., and Van Dijk, W. (1996) A missense mutation in the FUT6 gene results in total absence of alpha3-fucosylation of human alpha1-acid glycoprotein. *J Biol Chem* 271:14492-14495
- Brinkman-van der Linden, E. C. M., de Haan, P. F., Havenaar, E. C., van Dijk, W. (1998) Inflammation-induced expression of sialyl LewisX is not restricted to alpha₁-acid glycoprotein but also occurs to a lesser extent on alpha1-antichymotrypsin and haptoglobin. *Glycoconj J* 15:177-182
- Cheresh, D. A., Haynes, D. H., and Distasio, J. A. (1984) Interaction of an acute phase reactant, alpha₁-acid glycoprotein (orosomucoid), with the lymphoid cell surface: a model for non-specific immune suppression. *Immunology* 51:541-548
- Chiu, K. M., Mortensen R. F., Osmand A. P., and Gewurz H. (1977) Interactions of alpha₁-acid glycoprotein with the immune system. I. Purification and effects upon lymphocyte responsiveness. *Immunology* 32: 997-1005
- Costello, M., Fiedel, B. A., and Gewurz, H. (1979) Inhibition of platelet aggregation by native and desialised alpha₁ acid glycoprotein. *Nature* 281:677-678
- Costello, M. H., Gewurz, H., and Siegel, J. N. (1984) Inhibition of neutrophil activation by α_1 -acid glycoprotein. *Clin Exp Immunol* 55:465-472
- Daemen, M. A. R. C., Heemskerk, V. H., van 't Veer, C., Denecker, G., Wolfs, T. G. A. M., Vandenaabeele, P., and Burman, W. (2000) Functional protection by acute phase proteins α_1 -acid glycoprotein and α_1 -antitrypsin against ischemia/reperfusion injury by preventing apoptosis and inflammation. *Circulation* 102:1420-1426
- De Graaf, T. W., Van der Stelt, M. E., Anbergen, M. G., and van Dijk, W. (1993) Inflammation induced expression of Sialyl Lewis X-containing glycan structures on α_1 -acid glycoprotein (orosomucoid) in human sera. *J Exp Med* 177:657-666
- DeFouw, L. M., and DeFouw, G. O. (1999) Modulation of angiogenic endothelial permeability by the cAMP pathway. *Microvasc Res* 57:19-29
- Denko, C. W. and Wanek, K. (1984) Anti-inflammatory action of α_1 -acid glycoprotein in urate crystal inflammation. *Agents Action* 15:539-540
- Dirienzo, W., Stefanini, G. F., Miribel, L., Paulling, E. E., Canonica, G. W., Fudenberg, H. H. (1987) α_1 -acid glycoprotein (α_1 -AGP) on the membrane of human lymphocytes: possible involvement in cellular activation. *Immunol Lett* 15:167-170

- Elg, S. A., Mayer, A. R., Carson, L. F., Twiggs, L. B., Hill, R. B., and Ramakrishnan, S. (1997) Alpha₁-acid glycoprotein is an immunosuppressive factor found in ascites from ovaria carcinoma. *Cancer* 80:1448-1456
- Fournier, T., Mejdoubi-N, N., and Porquet, D. (2000) Alpha₁-acid glycoprotein: Extrahepatic expression and its regulation. *Mod Asp Immunobiol* 1:52-56
- Franzblau, C., Schmid, K., Faris, B., Beldekas, J., Garvin, P., Kagan, H. M., and Baum, B. J. (1976) The interaction of collagen with α_1 -acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 427:302-314
- Friedman, M. J. (1983) Control of malaria virulence by α_1 -acid glycoprotein, an acute phase (inflammatory) reactant. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:5421-5424
- Fuji, M., Takahashi, N., Hayashi, H., Furusho, T., Matsunaga, K., Yoshikumi, C. (1988) Comparative study of α_1 -acid glycoprotein molecular variants in ascitic fluid of cancer and non-cancer patients. *Anticancer Res* 8:303-306
- Haraldsson, B. S., Johnsson, E. K., and Rippe, B. (1992) Glomerular permselectivity is dependent on adequate serum concentrations of orosomucoid. *Kidney Int* 41:310-316
- Heyworth, P. G., and Segal, A. W. (1986) Further evidence for the involvement of a phosphoprotein in the respiratory burst of human neutrophils. *Biochem J* 239:723-731
- Hill, J., Lindsay, T. F., Ortiz, F., Yeh, C. G., Hechtman, H. B., and Moore, F. D., Jr. (1992) Soluble complement receptor type 1 ameliorates the local and remote organ injury after intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *J. Immunol* 149:1723-1728
- Hocheplied, T., Van Molle, W., Berger, F. G., Baumann, H., and Libert, C. (2000) Involvement of the acute phase protein α_1 -acid glycoprotein in nonspecific resistance to a lethal Gram-negative infection. *J Biol Chem* 275:14903-14909
- Johnsson, E., and Haraldsson, B. (1993) Addition of purified orosomucoid preserves the glomerular permeability for albumin in isolated perfused rat kidneys. *Acta Physiol Scand* 147:1-8
- Kremer, J. M. H., Wilting, J., and Janssen, L. M. H. (1988) Drug binding to human α_1 -acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol Rev* 40:1-47
- Lainé, E., Couderc, R., Roch-Arveiller, M., Vasson, M. P., Giroud, J. P., and Raichvarg, D. (1990) Modulation of human polymorphonuclear neutrophil functions by α_1 -acid glycoprotein. *Inflammation* 14:1-9
- Lee, E. S., and Kim, S. W. (1979) Adsorbed glycoproteins in platelet adhesion onto polymer surfaces: significance of the terminal galactose units. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 25:124-128
- Libert, C., Brouckaert, P., and Fiers, W. (1994) Protection by α_1 -acid glycoprotein against tumor necrosis factor-induced lethality. *J Exp Med* 180:1571-1575
- Libert, C., Van Molle, W., Brouckaert, P., and Fiers, W. (1995) Platelet-activating factor is a mediator in tumor necrosis factor/galactosamine-induced lethality. *J Inflamm* 46:139-143
- Libert, C., Hocheplied, T., Berger, F. G., Baumann, H., Fiers, W., and Brouckaert, P. (1998) High-level constitutive expression of α_1 -acid glycoprotein and lack of protection against tumor necrosis factor-induced lethal shock in transgenic mice. *Transgen Res* 7:429-435
- Liu, H. M., Takagaki, K., and Schmid, K. (1988) In vitro nerve-growth-promoting activity of human plasma α_1 -acid glycoprotein. *J Neurosci Res* 20:64-72
- Lögdberg, L., and Wester, L. (2000) Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. *Biochim Biophys Acta* 1482:284-297
- Mackiewicz, A., Ganapathi, M. K., and Kushner, I. (1987) Monokines regulate glycosylation of acute-phase proteins. *J Exp Med* 166:253-258
- Mackiewicz, A., Pawlowski, T., Mackiewicz-Pawlowska, A., Wiktorowicz, K., and Mackiewicz, S. (1987) Microheterogeneity forms of α_1 -acid glycoprotein as indicators of rheumatoid arthritis activity. *Clin Chim Acta* 163:185-190
- Mackiewicz, A., and Kushner, I. (1989) Interferon β /B-cell stimulating factor 2/interleukin 6 affects glycosylation of acute phase proteins in human hepatoma cell lines. *Scand J Immunol* 29:265-271

- Mackiewicz, A., Lacik, M., Gorny, A., and Baumann, H. (1993) Leukemia inhibitory factor, interferon gamma, and dexamethasone regulate N-glycosylation of alpha₁-protease inhibitor. *Eur J Cell Biol* 60:331-336
- Maeda, H., Murakami, O., Kann, M., Yamane, I. (1980a): The growth stimulating effect of alpha₁-acid glycoprotein in cells in culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 163:223-227
- Maeda, H., Nishi, K., and Mori, I. (1980b) Facilitating effects of alpha₁-acid glycoprotein on the passage of erythrocytes through the membrane filter. *Life Sci* 27:157-161
- Marino, M. W., Dunn, A., Grail, D., Inglese, M., Noguchi, Y., Richards, E., Jungbluth, A., Wada, H., Moore, M., Williamson, B., Basu, S., and Old, L. J. (1997) Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8093-8098
- McNamara, P. J., Brouwer, K. R., and Gillespie, M. N. (1986) Interaction of platelet activating factor (PAF) with human serum alpha₁-acid glycoprotein (AAG). *Biochem Pharmacol* 35:621-624
- Meri, S., and Pangburn, M. K. (1990) Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement: regulation via a sialic/polyanion binding site on factor H. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3982-3986
- Moore, D. F., Rosenfeld, M. R., Gribbon, P. M., Winlove, C. P., and Tsai, C. M. (1997) Alpha-1-acid (AAG, orosomucoid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. *Inflammation* 21:69-82
- Muchitsch, E.-M., Teschner, W., Linnau, Y., and Pichler, L. (1996) In vivo effect of alpha₁-acid glycoprotein on experimentally enhanced capillary permeability in guinea-pig skin. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 331:313-321
- Muchitsch, E.-M., Auer, W., and Pichler, L. (1998) Effects of alpha₁-acid glycoprotein in different rodent models of shock. *Fundam Clin Pharmacol* 12:173-181
- Muchitsch, E.-M., Varadi, K., and Pichler, L. (2000) Effects of alpha₁-acid glycoprotein on acute pancreatitis and acute lung injury in rats. *Arzneimittelforschung* 50:987-994
- Nakamura, T., Board, P. G., Matshushita, K., Tanaka, H., Matsuyama, T., and Matsuda, T. (1993) alpha₁-acid glycoprotein expression in human leukocytes: possible correlation between alpha₁-acid glycoprotein and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Inflammation* 17:33-45
- Pimpaneau, V., Midoux, G., Durand, P., De Baetselier, P., Monsigny, M., and Roche A. C. (1989) Endocytosis of alpha₁-acid glycoprotein variants and neoglycoproteins containing mannose derivatives by a mouse hybridoma cell-line (2C11-12). Comparison with mouse peritoneal macrophages. *Glycoconjugate J* 6:561-574
- Pos, O., Oostendorp, R. A., van der Stelt, M. E., Scheper, R. J., and Van Dijk, W. (1990) Con A-nonreactive human alpha₁-acid glycoprotein (AGP) is more effective in modulation of lymphocyte proliferation than Con A-reactive AGP serum variants. *Inflammation* 14:133-141
- Pous, C., Chauvelot-Moachon, L., Lecoustillier, M., and Durand, G. (1992) Recombinant human interleukin 1 beta and tumor necrosis factor affect glycosylation of serum alpha₁-acid glycoprotein in rats. *Inflammation* 16:197-203
- Samak, R., Edelstein, R., and Israel, L. (1982) Immunosuppressive effect of the acute phase reactant proteins in vitro and its relevance to cancer. *Cancer Immunol Immunother* 13:38-43
- Schmid, K., et al (1977) *Biochim Biophys Acta* 492:291
- Schnitzer, J. E., and Pinney, E. (1992) Quantitation of specific binding to orosomucoid to cultured microvascular endothelium: role in capillary permeability. *Am J Physiol* 263:H48-H55
- Shiyan, S. D., Pukhal'skii, A. L., Toptygina, A. P., Nasonov, V. V., and Bovin, N. V. (1994) Conjugates of the carbohydrate chains of the alpha₁-acid glycoprotein with polyacrylamide retain the immunomodulating activity of the natural glycoprotein. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 20:550-555
- Simpson, R., Alon, R., Kobzik, L., Valeri, C. R., Shepro, D., and Hechtman, H. B. (1993) Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 218:444-454
- Singh, V. K., and Fudenberg, H. H. (1986) Lymphocyte stimulation in vitro by orosomucoid glycoprotein. *Immunol Lett* 14:9-13

- Singh, V. K. and Fudenberg, H. H. (1987) Orosomucoid: An update of immune function. *Clin Immunol Newslett* 8:164-166
- Snyder, S., and Coodley, E. L. (1976) Inhibition of platelet aggregation by α_1 -acid glycoprotein. *Arch Intern Med* 136:778-781
- Sörensson, J., Matejka, G. L., Ohlson, M., and Haraldsson, B. (1999) Human endothelial cells produce orosomucoid, an important component of the capillary barrier. *Am J Physiol* 276 (Heart Circ Physiol 45):H530-H534
- Sörensson, J., Ohlson, M., Björnson, A., and Haraldsson, B. (2000) Orosomucoid has a cAMP-dependent effect on human endothelial cells and inhibits the action of histamine. *Am J Heart Circ Physiol* 278:H1725-H1731
- Staprans, I., and Felts, J. M. (1977) The effect of α_1 -acid glycoprotein (orosomucoid) on triglyceride metabolism in the nephrotic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 79:1272-1278
- Su, S. J., and Yeh, T. M. (1996) Effects of α_1 -acid glycoprotein on tissue factor expression and tumor necrosis factor secretion in human monocytes. *Immunopharmacology* 34:139-145
- Su, S.-J., Yang, B.-C., Wang, Y.-S., and Yeh, T.-M. (1999) α_1 -acid glycoprotein-induced tumor necrosis factor- α secretion of human monocytes is enhanced by serum binding proteins and depends on protein tyrosine kinase activation. *Immunopharmacology* 41:21-29
- Tamura, K., Shibata, Y., Matsuda, Y., and Ishida, N. (1981) Isolation and characterization of an immunosuppressive acidic protein from ascitic fluids of cancer patients. *Cancer Res* 41:3244-3252
- Tilg, H., Vannier, E., Vachino, G., Dinarello, C. A., and Mier, J. W. (1993) Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 β synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 178:1629-1636
- Turner, G. A. (1992) N-glycosylation of serum glycoproteins in disease and its investigation using lectins. *Clin Chim Acta* 208:149-171
- van Dijk, W., Pos, O., Van der Stelt, M. E., Moshage, H. J., Yap, S.-H., Dente, L., Baumann, P., and Eap, C. B., (1991) Inflammation-induced changes in expression and glycosylation of genetic variants of α_1 -acid glycoprotein. Studies with human sera, primary cultures of hepatocytes and transgenic mice. *Biochem J* 276:343-347
- van Dijk, W., Turner, G. A., and Mackiewicz, A. (1994) Changes in glycosylation of acute-phase proteins in health and disease: occurrence, regulation and function. *Glycosyl Dis* 1:5-14
- van Dijk, W., Havenaar, E. C., and Brinkman-Van der Linden, E. C. M. (1995) α_1 -acid glycoprotein (orosomucoid): pathophysiological changes in glycosylation in relation to its function. *Glycoconjugate J* 12:227-233
- van Hinsbergh, V. W. M., van Nieuw Amerongen, G. P., and Draijer, R. (1997) Regulation of the permeability of human endothelial cell monolayers. In: *Vascular Endothelium. Physiology, Pathology and Therapeutic Opportunities*. Born, G. V. R., and Schwarz, C. J., Eds. Stuttgart, Germany: Schattauer, vol. 3, pp. 61-76
- Van Molle, W., Libert, C., Fiers, W., and Brouckaert, P. (1997) α_1 -Acid glycoprotein and α_1 -antitrypsin inhibit TNF-induced but not anti-Fas-induced apoptosis of hepatocytes in mice. *J Immunol* 159:3555-3564
- Van Molle, W., Denecker, G., Rodriguez, I., Brouckaert, P., Vandenabeele, P., and Libert, C. (1999) Activation of caspases in lethal experimental hepatitis and prevention by acute phase proteins. *J Immunol* 163:5235-5241
- Vasson, M. P., Roch-Arveiller, M., Couderc, R., Baguet, J. C., and Raichvarg, D. (1994) Effects of α_1 -acid glycoprotein on human polymorphonuclear neutrophils: influence of glycan microheterogeneity. *Clin Chim Acta* 224:65-71
- Watanabe, M., Iwai, K., Shibata, S., Takahashi, K., Narui, T., and Tashiro, T. (1986) Purification and characterization of mouse α_1 -acid glycoprotein and its possible role in the antitumor activity of some lichen polysaccharides. *Chem Pharm Bull* 34:2532-2541
- Williams, J., Weiser, M. R., Pechet, T. T. V., Kobzik, L., Moore, F. D., and Hechtman, H. B. (1997) α_1 -Acid glycoprotein reduces local and remote injuries after intestinal ischemia in the rat. *Am J Physiol* 273:G1031-G1035

Wroblewski, Z. (1981) Interaction of acid alpha₁-glycoprotein with immunoglobulins. *Acta Biochim Pol* 28:21-30

Wroblewski, Z., and Mejbbaum-Katzenellenbogen, W. (1984) Complexes of acid alpha₁-glycoprotein with immunoglobulins G in normal human blood serum. *Acta Biochim Pol* 31:17-24

Wu, J., Zeng, Y. X., and Hirokawa, K. (1999) Signal pathway of mitogen-induced Ca²⁺-activated K⁺ currents in young and aged T-cell clones of C57BL/6 mice. *Cell Signal* 11:391-398

Yoshima, H., Matsumoto, A., Mizuochi, T., Kawasaki, T., and Kobata, A. (1981) Comparative study of the carbohydrate moieties of rat and human plasma alpha₁-acid glycoproteins. *J Biol Chem* 256:8476-8484

I.4. α_2 -MACROGLOBULINE

α_2 -Macroglobuline (α_2 M) behoort tot de familie van de thiolester-bevattende eiwitten. Tot deze familie behoren ondermeer ook de complement proteïnen C3 en C4. Deze familie van α -macroglobulines wordt onderverdeeld in 2 groepen op basis van hun functionaliteit: de inhibitorische en de niet-inhibitorische, complement componenten. Er zijn geen gevallen gekend bij zoogdieren van α M's die zowel proteïnase-inhibitorische als complement activiteit vertonen.

De eiwitten van de α -macroglobuline familie vertonen, naast sekwentie homologie, een aantal gemeenschappelijke kenmerken: (i) ze bezitten subeenheden van ongeveer dezelfde grootte, (ii) ze bezitten allemaal een zogenaamde 'aas-regio' ('bait region'), ongeveer in het midden van de keten, die gevoelig is voor proteolyse en tenslotte (iii) bezitten ze een interne thiol-ester (uitgezonderd ovostatine, uit het eiwit van kippen) (Salvesen en Engild, 1993).

De α M subeenheid is 180 kDa groot. In de loop van de evolutie van deze superfamilie zijn de subeenheden gaan multimeriseren, zodat er naast monomeren (bv. C3, C4, murinoglobuline) ook dimeren (bv. 'pregnancy zone protein') en tetrameren (bv. α_2 -macroglobuline) ontstaan zijn die uit identieke subunits bestaan.

α -Macroglobulines zijn grote glycoproteïnen die voorkomen in het serum van vertebraten, in de hemolymfe van invertebraten (Armstrong en Quigley, 1987), en in het eiwit van vogels en reptielen (Delain *et al.*, 1992; Van Leuven, 1982).

I.4.1. Muis α -macroglobulines

In muis plasma zijn 2 verschillende types inhibitorische α -macroglobulines aanwezig: het tetramere muis α_2 M (MAM) en het monomere murinoglobuline (MUG).

I.4.1.1. α_2 -Macroglobuline

MAM bestaat uit subeenheden met een moleculair gewicht van 165 en 35 kDa, in tegenstelling tot de klassieke 180 kDa bij humaan en de meeste andere α_2 M's (Salvesen en Engild, 1993). Beide subeenheden zijn echter afkomstig van één grote precursor die intracellulair verknipt wordt (Van Leuven *et al.*, 1992).

Het MAM gen bevindt zich op chromosoom 6, in een regio die meerdere genen bevat die syntenisch zijn met humaan chromosoom 12 (Hilliker *et al.*, 1992). De subeenheden worden gecodeerd door een mRNA van ongeveer 5 kb, dat voornamelijk in de lever geëxprimeerd wordt. Expressie van het MAM mRNA start in de foetale lever vanaf 13dpc. In pasgeboren muizen is de serumconcentratie ongeveer 1 mg/ml. Deze concentratie stijgt verder tijdens de prepuberale ontwikkeling tot het volwassen niveau (1-2 mg/ml) bereikt wordt, dat hoger is bij mannetjes dan bij vrouwtjes (Overberg *et al.*, 1995). MAM (maar ook rat α_2 M) kan beschouwd worden als een acute fase proteïne, aangezien tijdens een inflammatoire

stimulus de concentratie kan stijgen met 66%. De concentratie van MUG daarentegen blijft constant en is dus geen AFP (Isaac *et al.*, 1999).

I.4.1.2. Murinoglobuline

Muis murinoglobuline (MUG) is een monomeer plasma glycoproteïne van 180 kDa. Er werden 4 murinoglobuline genen gekarakteriseerd (Overberg *et al.*, 1994). Er werden echter slechts 3 verschillende cDNA's geïsoleerd en gesequenciert. 2 ervan bezaten een open leesraam, terwijl het derde aberrant was (ondermeer als gevolg van een leesraam mutatie, resulterend in een prematuur terminatie codon). Er werd daarentegen slechts één murinoglobuline eiwit geïsoleerd uit het plasma, dat afkomstig was van het meest abundante cDNA, en dat MUG1 genoemd werd (Overberg *et al.*, 1991).

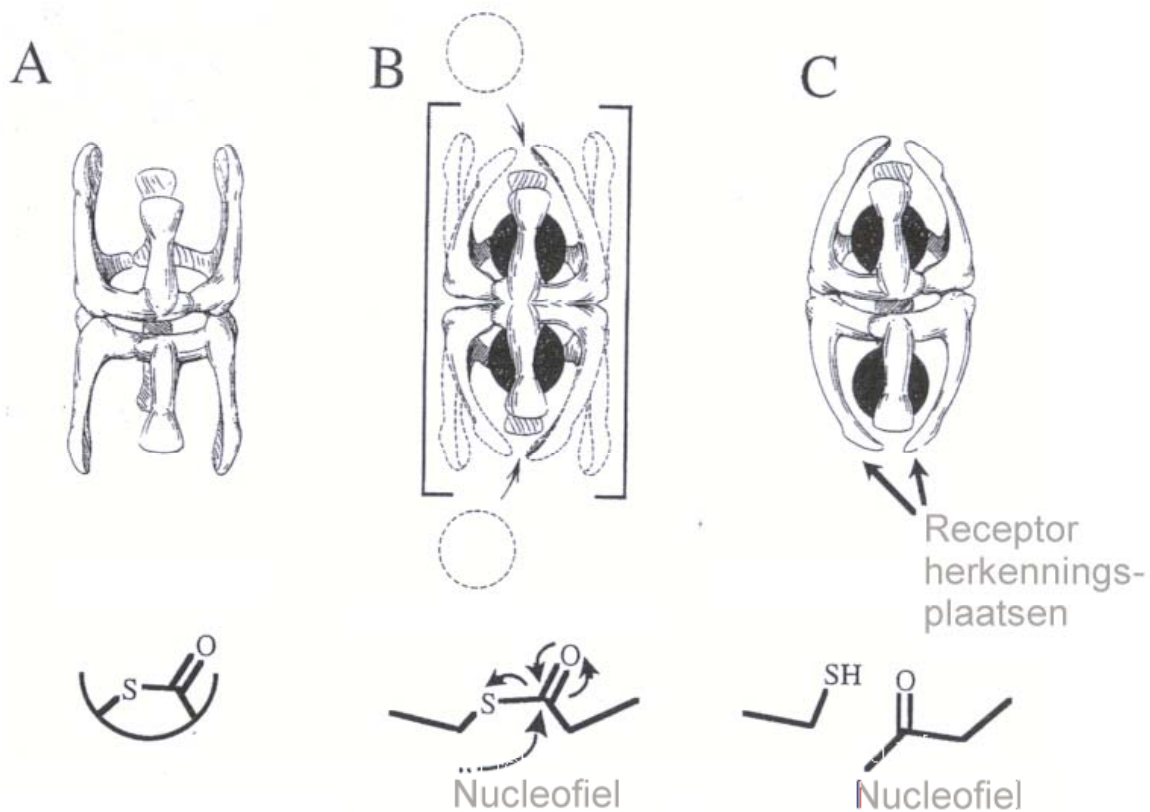
I.4.2. Werkingsmechanisme van de α -macroglobulines met protease-inhiberende activiteit

Er bevinden zich 3 belangrijke domeinen in het α -macroglobuline eiwit: de 'aas-regio', de interne thiolester (Howard, 1981) en het receptor bindingsdomein. De 'aas-regio' is zo'n 30 aminozuren lang en bezit knipplaatsen voor proteasen van alle klassen (serine-, cysteïne-, aspartaat-, en metalloproteasen) (Dodds en Law, 1998). Wanneer een protease deze 'aas-regio' knipt, leidt dit tot een conformatieverandering van het α -macroglobuline. Dit zorgt ervoor dat de thiolester binding gevoelig wordt voor een nucleofiele aanval door het protease, waardoor dit covalent aan het α_2 M kan gebonden worden. De thiolester functie bij tetramere α_2 M's is niet volledig duidelijk, aangezien covalente binding van het protease niet noodzakelijk is voor de inhibitie ervan. Bij monomere leden van de α_2 M-familie echter, zoals murinoglobuline, is dergelijke covalente binding wel vereist (Salvesen en Engild, 1993). Door de conformatiewijziging zal het α_2 M zich om het protease heen vouwen, dat zo fysisch gevangen wordt (Barret en Starkey, 1973) (figuur I.11). Het protease wordt op deze manier sterisch gehinderd door het grote α_2 M, waardoor het protease wel nog reactiviteit kan vertonen tegenover kleine substraten, zoals peptiden, maar nagenoeg volledig inactief is voor grote substraten (eiwitten groter dan 30 kDa). Het actief centrum van het protease is dus nog open, in tegenstelling met alle andere gekende mechanismen van protease inhibitoren, die rechtstreeks het actief centrum binden. In de meeste gevallen worden twee van de vier subeenheden geknipt per protease molecule die gebonden wordt, wat suggereert dat er één actieve protease plaats is voor elk dimeer van de subunit ketens, of twee per intact α_2 M dimeer. Het α_2 M-protease complex bezit een hogere electroforetische mobiliteit onder natieve omstandigheden, wegens de compactere structuur, en wordt de 'fast' (F) electroforetische vorm genoemd.

Murinoglobuline bezit een protease bindingspectrum dat gelijkaardig is als dat van MAM, maar het inhibeert de gebonden proteasen niet *senso stricto*. Het vormt eerder een

'kenteken' voor de herkenning en verwijdering van het complex via receptor gemedieerde endocytose door de α_2 -macroglobuline receptor (α_2 MR) (Abe *et al.*, 1989). Dit mechanisme heeft als gevolg dat het repertoire aan doel-proteasen groter is voor tetramere dan voor monomere en dimere α_2 M's (Sottrup-Jensen, 1989).

De 'aas-regio' is de minst geconserveerde regio in de α -macroglobuline familie (Geiger *et al.*, 1988). Deze variatie doet suggereren dat alhoewel een breed gamma aan proteasen geïnhibeerd wordt, verschillende leden van de α -macroglobuline-familie toch een verschillend protease-inhiberend spectrum bezitten.



Figuur I.11: Schematische voorstelling van de conformatie wijziging van α_2 M. α_2 M is voorgesteld als een dubbelzijdige moleculaire kooi waarvan de armen zich om het gevangen protease sluiten. De aas regio en de thioester liggen diep in de cilinder. (A) Natief α_2 M is in staat proteasen te inhiberen, maar bezit geen receptor bindingsplaats. (B) Proteasen kunnen gevangen worden na knippen van de aas-regio. Knippen van deze regio initieert een conformatieverandering die via een metastabiel intermediair verloopt. Ondertussen ondergaan de thioesters hydrolyse of nucleofiele substitutie. (C) Het product van de conformatieverandering (α_2 M*), wordt gekarakteriseerd door een compactere structuur, vrijgekomen receptor-herkenningsplaatsen, verlies van verdere protease-inhibitorische eigenschappen en 4 vrije thiolgroepen.

I.4.3. De α_2 -macroglobuline receptoren

De geactiveerde vorm van α_2 M (α_2 M*) is de vorm die ontstaat na binding van een protease. Deze vorm bindt twee types van celmembraan receptoren: de α_2 -macroglobuline receptor, die eerst beschreven werd, en de α_2 -macroglobuline signalisatie receptor.

I.4.3.1. De α_2 -macroglobuline receptor

De α_2 -macroglobuline receptor (α_2 MR), ook wel laag dichtheits lipoproteïne receptor verwant eiwit (LRP) genoemd maakt deel uit van een familie van membraan gebonden receptoren die endocytose van verscheidene lipoproteïnen en plasma eiwitten in dierlijke cellen mediëren (Strickland *et al.*, 1994).

Hij wordt gesynthetiseerd als een precursor van 600 kDa die verknipt wordt in een fragment van 515 en een van 85 kDa. De grootste subeenheid associeert op een niet-covalente wijze met de kleinere subeenheid. De 85 kDa subeenheid bezit een transmembraan domein en een cytoplasmatisch domein met 2 NPXY sekwenties die dienen als clustering signalen voor endocytose via 'coated pits'.

De receptor komt voor op veel verschillende celtypes, maar wordt het meest abundant geëxprimeerd in de lever, hersenen, en placenta (Gafvels *et al.*, 1992; Jensen *et al.*, 1988). In het centraal zenuwstelsel is de receptor aanwezig op neuronen, maar werd eveneens aangetoond in de seniele plaques, typisch voor de ziekte van Alzheimer (Rebeck *et al.*, 1993; Tooyama *et al.*, 1993).

I.4.3.2. De α_2 -macroglobuline signalisatie receptor

Een tweede receptor, die op macrofagen voorkomt, is de G-proteïne gekoppelde α_2 -macroglobuline signalisatie receptor (α_2 MSR). Ligatie van de α_2 MSR door α_2 M* leidt tot de activatie van een fosfatidyl-specifiek fosfolipase C (PLC) gekoppeld aan een G-proteïne, waardoor inositol trifosfaat (IP₃) en een verhoogd intracellulair Ca²⁺ niveau ontstaat. Binding van deze receptor induceert tyrosine-fosforylatie van PLC, doet de pH van het cytosol stijgen, stimuleert mitogenese, verhoogt het p21RasGTP niveau en verhoogt PI 3-kinase activiteit (Misra *et al.*, 1994; Misra en Pizzo, 1999).

I.4.4. Ligand binding en receptor gemedieerde endocytose

De α_2 MR bindt specifiek α -macroglobuline protease-complexen met hoge affiniteit en wordt vervolgens geïnternaliseerd via receptor-gemedieerde endocytose. In de lysosomen wordt het complex gedegradeerd, waarbij de receptor gevrijwaard blijft en terug naar het oppervlak van de cel gerecycleerd wordt (Van Leuven *et al.*, 1979). Recycleren van de receptor blijkt een continu proces, onafhankelijk van het feit of er een α M-protease complex op gebonden zit of niet (Van Leuven *et al.*, 1980).

De α_2 MR bindt niet enkel α M-protease complexen. Er werd aangetoond dat een breed gamma aan schijnbaar onverwante liganden, zoals protease inhibitoren, hemostatische factoren en lipoproteïnen door de receptor gebonden worden (Van Leuven *et al.*, 1979).

De α_2 M-receptor is absoluut noodzakelijk tijdens de ontwikkeling, aangezien muizen deficiënt in deze receptor sterven voor dag 14 van de ontwikkeling. Heterozygote embryo's ontwikkelen zich daarentegen tot normale muizen (Herz *et al.*, 1993; Herz *et al.*, 1992).

I.4.5. Biologische eigenschappen van α_2 -macroglobuline

De biologische rol van de complement α -macroglobulines is zo goed als gekend. De rol van de protease-inhibitorische activiteit is echter niet zo duidelijk.

I.4.5.1. α_2 -Macroglobuline als breed-spectrum protease inhibitor

α_2 M is een goede inhibitor voor een groot aantal proteasen, maar bijna altijd zijn er betere en meer specifieke protease inhibitoren in het lichaam aanwezig. α_2 M speelt dus waarschijnlijk een belangrijke rol als algemeen reserve-systeem door alle proteasen die aan specifieke inhibitoren ontsnappen, bijvoorbeeld na verzadiging van de specifieke inhibitor, te binden en te verwijderen (Travis en Salvesen, 1983). Proteasen vormen een belangrijke categorie van virulentie factoren van bacteriën en prokaryote pathogenen. Ze helpen bij de invasie en de destructieve groei van de pathogenen. α_2 M speelt als evolutionair geconserveerde arm van het aangeboren immuun systeem een belangrijke rol in de initiële verdediging tegen dergelijke pathogenen door hun proteasen onschadelijk te maken (Armstrong en Quigley, 1999). Zo kan α_2 M binden op door *Pseudomonas aeruginosa* geproduceerd elastase en op deze manier bescherming bieden tegen een *P. aeruginosa* infectie (Khan *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 1994; Holder en Haidaris, 1979). Binding en opname van een α_2 M-protease complex in een cel kan echter ook een tegenovergesteld resultaat opleveren. In bepaalde gevallen is het mogelijk dat het protease in de cellen niet afgebroken wordt, maar dat het de cel integriteit van binnenuit aantast en uiteindelijk de cel vernietigt (Maeda *et al.*, 1989).

Daarnaast kan binding van een protease door α_2 M de opname en afbraak ervan in macrofagen versnellen en op deze manier zorgen voor een efficiëntere presentatie van het protease aan T-cellen (Chu en Pizzo, 1993).

α_2 M (maar ook AGP en α_1 -antitrypsine) binden het protease dat verantwoordelijk is voor de vrijstelling van TNF (waarschijnlijk TACE), waardoor TNF-vrijstelling geïnhibeerd wordt (Scuderi *et al.*, 1989).

I.4.5.2. α_2 -Macroglobuline bindt cytokines en groeifactoren

Naast zijn anti-protease activiteit is α_2 M ook in staat om een aantal cytokines en groeifactoren te binden: o.a. TNF, PDGF, TGF β , β -FGF, IL-1 β , IL-2, IL-6 (James, 1990). In een aantal gevallen gebeurt de binding enkel op het α_2 M-protease complex en niet op de native moleculen (bv. IL-1 β , TNF, IL-4, IL-10 (Garber *et al.*, 2000; Wollenberg *et al.*, 1991; Borth *et al.*, 1990)). De biologische gevolgen van de α_2 M-cytokine interacties zijn variabel. In bepaalde gevallen wordt de activiteit van het cytokine geïnhibeerd (IL-2, β FGF) (Dennis *et al.*, 1989; Borth en Teoderescu, 1986). Meestal echter is er geen gevolg voor de biologische activiteit waar te nemen (PDGF, TGF β , IL-1 β en IL-6, IL-8). Een ander mogelijk gevolg van de binding van α_2 M met cytokines is dat de distributie, de biobeschikbaarheid, de stabiliteit en de verwijdering van de cytokines beïnvloed wordt (James, 1990). Een aantal cytokines

zijn door hun binding met α_2M beschermd tegen proteolytische afbraak (bv. IL-8, NGF (Kurdowska *et al.*, 1997; Koo en Stach, 1989)).

α_2M bindt ook mitogenen, zoals ConA, phytohemagglutinine en LPS, histonen en verscheidene ionen als zink en nikkel (James, 1980).

α_2M afkomstig van paard of cavia is in staat de infectie door bepaalde Influenza serotypes tegen te gaan. Dit effect blijkt te wijten aan een speciaal siaalzuur dat beide α_2M species dragen, nl. 4-O-acetyl-siaalzuur. De suikerketens op zich boden echter geen bescherming. Waarschijnlijk speelt de ruimtelijke ordening van de gemodificeerde siaalzuren dus ook een rol (Pritchett en Paulson, 1989).

I.4.5.3. Immunomodulerende functie van α_2M

Net zoals AGP, oefent α_2M een aantal immunomodulerende activiteiten uit zoals inhibitie van neutrofiel chemotaxis en van fagocytose (van Gool *et al.*, 1982).

I.4.5.4. Anti apoptotische eigenschappen van α_2M

Serum depletie veroorzaakt celdood omdat dit groeifactoren en adhesiemoleculen bezit die essentieel zijn voor de overleving van de cel, maar heel waarschijnlijk ook omdat er zich anti apoptotische factoren in bevinden, waaronder α_2M , α_1 -antitrypsine en α_1 -antichymotrypsine. Opgroeien van humane vasculaire gladde spiercellen in medium met serum waar bovenstaande protease inhibitoren uit gedepleteerd werden, veroorzaakte apoptose van de cellen, doordat de extracellulaire matrix (ECM) afgebroken werd. Toevoegen van een of meerdere van deze protease inhibitoren inhieerde afbraak van de ECM en de daaruit resulterende apoptose (Ikari *et al.*, 2001)

I.4.5.5. *In vivo* beschermende eigenschappen

α_2M biedt bescherming in een hepatitis model, geïnduceerd door GalN. Alhoewel de UDPG-depletie en de daaruit resulterende deficiëntie in glycoproteïne-synthese niet gewijzigd wordt door α_2M , treedt er geen celschade op, mogelijks door een stabiliserend effect van α_2M op de plasma membraan (van Gool *et al.*, 1978).

Voorbehandeling met α_2M kon ratten ook beschermen tegen letale brandwonden (Sevaljevic *et al.*, 1994).

I.4.6. α_2 -Macroglobuline is genetisch geassocieerd met de ziekte van Alzheimer

α_2M werd in verband gebracht met de ziekte van Alzheimer doordat het de opruiming en degradatie van A β , de grootste component van β -amyloid plaques, kan mediëren (Lauer *et al.*, 2001). Analyse van een deletie in het humane α_2M gen (in exon 18) heeft aangetoond

dat overerving van de deletie kan leiden tot een verhoogd risico op de ontwikkeling van de ziekte (Blacker *et al.*, 1998). Andere studies hebben echter geen verband kunnen aantonen tussen overerving van deze deletie en een verhoogde kans op het ontwikkelen van de ziekte (Nacmias *et al.*, 2001).

I.4.7. Fenotype van α_2 -macroglobuline (en murinoglobuline) -deficiënte muizen

Aangezien er in de menselijke populatie geen gevallen gekend zijn van α_2 M-deficiëntie, werd ervan uitgegaan dat dit een levensnoodzakelijk eiwit was of dat dergelijke mutatie fenotypisch niet tot uiting komt. Er werden α_2 M deficiënte muizen gemaakt die inderdaad nauwelijks een fenotype vertonen. De MAM^{-/-} muizen waren wel beschermd tegen LPS en waren gevoeliger voor het ontwikkelen van acute pancreatitis wanneer ze op een choline/methionine vrij dieet gezet werden dat gesupplementeerd werd met ethionine (Umans *et al.*, 1995).

Een mogelijke verklaring voor de LPS resistentie werd gegeven door Webb *et al.* α_2 M is in staat om *in vivo* TGF β te neutraliseren en NO te induceren (MUG daarentegen is niet in staat NO te induceren) (Lysiak *et al.*, 1995). De afwezigheid van MAM in de MAM^{-/-} muizen laat TGF β toe om overdadige iNOS expressie - en dus NO vrijstelling - te inhiberen na injectie van LPS (Webb *et al.*, 1996). Hoge concentraties MAM daarentegen kunnen ook bescherming bieden tegen endotoxines. Dit zou volgens van Vugt *et al.* het gevolg kunnen zijn van een interactie van MAM met PGE₂, een vasodilaterend eicosanoid dat tijdens endotoxine shock vrijgesteld wordt, waardoor vasodilatatie en de daarmee gepaard gaande vasculaire permeabiliteit gereduceerd worden (van Vugt *et al.*, 1986).

De symptomen van acute pancreatitis waren het ergst in de MAM^{-/-} muizen en waren niet erger in de MAM^{-/-} MUG^{-/-} dubbel deficiënte muizen. Dit duidt erop dat het tekort aan protease inhibitie in de MAM^{-/-} muizen niet de oorzaak is van de acute pancreatitis. Het verschil in mortaliteit tussen MAM^{-/-} en MUG^{-/-} deficiënte muizen zou kunnen te wijten zijn aan de differentiële bindingskarakteristieken van cytokines of groeifactoren door beide eiwitten (Umans *et al.*, 1999).

I.5. BEKNOPTE BESCHRIJVING VAN DE GEBRUIKTE MUIS MODELLEN

Tijdens het doctoraat werd gebruik gemaakt van verschillende muis modellen. Deze zullen hierna kort beschreven worden. Deze bespreking beperkt zich tot een algemene beschrijving van het muis model en de reden waarom dit gekozen werd. Voor de technische uitleg (geïnjecteerde dosis, te meten parameters,...) over de gebruikte modellen wordt echter verwezen naar elk hoofdstuk afzonderlijk in het onderdeel materialen en methoden.

Het is wel belangrijk eerst op te merken dat een proefdiermodel niet alle aspecten van een bepaalde humane aandoening exact weerspiegelt. De keuze van een bepaald proefdiermodel hangt dan ook af van de specifieke wetenschappelijke vraag die men wenst te beantwoorden.

I.5.1. Niet specifieke resistentie tegen infectie

Zoogdieren vertonen een hoge graad aan niet specifieke resistentie tegen infectie (NSRI) door de vele potentiële pathogenen waarmee ze dagelijks in contact komen en die zelfs een commensaal leven kunnen leiden in hun lichaamsholten. Er is al veel onderzoek gedaan naar allerlei mechanismen en componenten die bijdragen tot de verdediging van de gastheer. Zo kan NSRI verhoogd worden door toedienen van lage doses endotoxines, muramyldipeptides en andere al dan niet synthetische componenten die gebaseerd zijn op de structuur van de bacteriële celwand. De bescherming die daardoor optreedt is duidelijk niet-specifiek, aangezien bijvoorbeeld endotoxines van Gram negatieve bacteriën kunnen beschermen tegen letaliteit veroorzaakt door een organisme dat antigenisch totaal niet verwant is, zoals *Candida albicans*.

Het ophelderen van de endogene beschermingsmechanismen tegen bacteriële infectie komt opnieuw meer en meer aan de orde, doordat bacteriën steeds resistenter worden tegen de huidige antibiotica. Het ophelderen van endogene beschermingsmechanismen kan eventueel leiden tot een totaal nieuwe soort van therapie. Dat dit geen overbodige luxe is, valt af te leiden uit de sterftcijfers (> 100.000 sterfgevallen/jaar in de VS (Stone, 1994)) bij patiënten met septische shock, dat trouwens de meest voorkomende doodsoorzaak is van patiënten in de afdeling 'intensieve zorgen'. De bacteriën die de oorzaak zijn van septische shock (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* (gezamenlijk de coliforme bacillen genoemd) en *Proteus*) zijn in normale omstandigheden nochtans niet schadelijk voor de gastheer. Het is dan ook maar in gevallen waarbij het immuunsysteem van de gastheer niet meer naar behoren functioneert dat deze bacteriën zich kwasi ongestoord kunnen vermenigvuldigen en verspreiden in de gastheer (vandaar de naam opportunistische pathogenen), met in vele gevallen de dood tot gevolg.

Voor de studie van de betrokkenheid van AGP in NSRI hebben we gebruik gemaakt van de Gram negatieve bacteriën *Klebsiella pneumoniae* om muizen mee te infecteren. Na *E. coli* is

dit de meest frekwent geïsoleerde stam bij sepsis. *K. pneumoniae* (vroeger *Friedlander's bacillus* genoemd) zijn Gram negatieve, niet-beweeglijke bacteriën, die grote, kleverige kolonies vormen op een voedingsbodem. Ze produceren een hitte stabiel enterotoxine, dat waarschijnlijk bijdraagt tot de pathogeniciteit ervan. *Klebsiella* species kunnen een R-plasmide bezitten, waardoor ze resistent zijn tegen bepaalde antibiotica. *Klebsiella* werd initieel beschreven als een groep bacteriën die longontsteking kunnen veroorzaken. *K. pneumoniae* is echter maar betrokken in een klein percentage van de gevallen.

Voor de experimenten werd gebruikgemaakt van de stam *K. pneumoniae* 43816, serotype 2 (ATCC, Manassas, VA). Dit is de *K. pneumoniae* stam die het meest voorkomt in literatuur handelend over septische shock. Bij intratrachale (Tsai *et al.*, 1998; Bailie *et al.*, 1996) toediening veroorzaakt deze stam longontsteking, terwijl bij intraperitoneale (Wang *et al.*, 1999; Belaouaj *et al.*, 1998) of intramusculaire (Vogels *et al.*, 1994; van der Meer, 1988; Chedid *et al.*, 1977) toediening septische shock veroorzaakt wordt door de vlugge verspreiding, via het bloed, naar de verschillende organen. Dit resulteert in een overdreven en algemene inflammatoire reactie, die uitmondt in multi-orgaan falen (MOF) en uiteindelijk letaliteit. Deze algemene inflammatoire reactie is het gevolg van de overproductie van pro-inflammatoire cytokines en andere pro-inflammatoire mediators (stollingsfactoren, vasodilaterende factoren, ...), die in normale gevallen een positieve werking uitoefenen en de infectie helpen te bestrijden, maar in extreme gevallen de gastheer meer schade berokkenen dan ze goed doen.

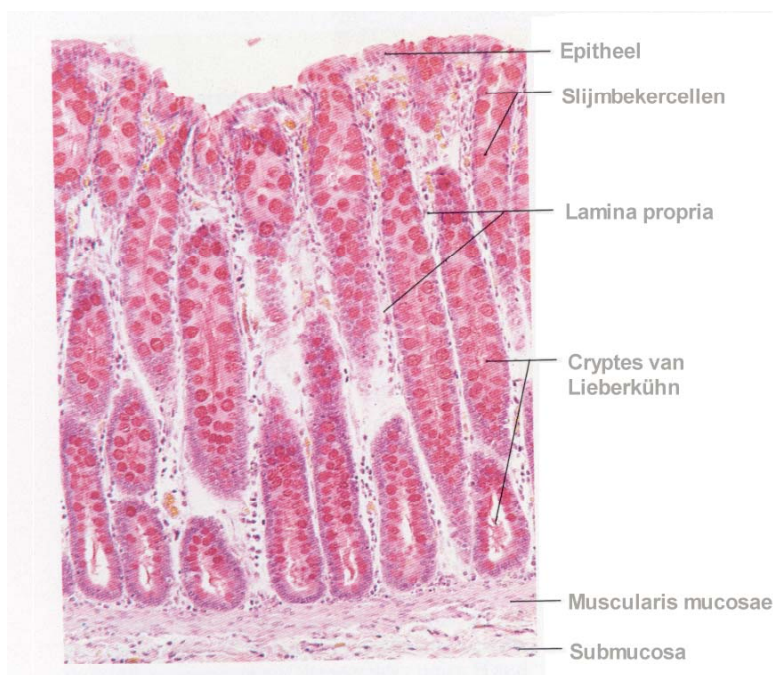
I.5.2. Inflammatoir darmlijden

Inflammatoir darmlijden (IBD) kan eigenlijk opgeplitst worden in twee soorten pathologieën, namelijk de ziekte van Crohn en ulceratieve colitis. Beide zijn chronische aandoeningen van de darmen, met afwisselende periodes van inflammatie (relaps). De ziekte van Crohn wordt gekarakteriseerd door transmurale inflammatie gekenmerkt door granuloma-vorming, die over het ganse gastrointestinaal kanaal kan voorkomen en een 'gevekt' patroon vertoont. De dunne darm (ileum) wordt echter het meest aangetast. Ulceratieve colitis daarentegen is beperkt tot het colon en meestal worden enkel de bovenste lagen (van epitheelcellen tot submucosa, figuur I.12) van de darm aangetast. De ziekte vertoont een continu patroon en gaat niet gepaard met granuloma-vorming.

De eerste ziekteverschijnselen doen zich voor tussen 15 en 30 jaar. IBD komt vooral voor in de 'ontwikkelde' landen. De prevalentie is ongeveer 0.1-0.2%, en de incidentie bedraagt 2-4/100.000. De oorzaak van de ziekte is tot op heden niet duidelijk. Een van de meest gehanteerde hypothesen (op basis van onderzoek uitgevoerd zowel op patiënten met IBD als op proefdiermodellen voor darm inflammatie) is dat IBD een heterogene groep van ziektes is, die zich op eenzelfde manier manifesteren, namelijk via inflammatie van het mucosa, en waar verscheidene genetische als omgevingsfactoren bij betrokken zijn. Dit zou

dan leiden tot een ontregelde immuunrespons tegenover een of meerdere antigenen in het mucosa, waar ook de commensale bacteriën een niet-onbelangrijke rol in spelen (Konstantinos, Papadakis, 1999). Het tijdsinterval tussen de initiële oorzaken en de uiteindelijke diagnose van de ziekte kan heel groot zijn (jaren). Dit maakt het moeilijk de oorzaken van de ziekte te identificeren en te bestuderen (Andres en Friedman, 1999).

Er zijn veel verschillende proefdiermodellen beschreven in de literatuur om IBD te bestuderen. Elk van deze proefdiermodellen vertoont bepaalde overeenkomsten met een bepaald aspect van de pathologie van IBD. Zo zijn er muizen beschreven die spontaan IBD ontwikkelen (bv. C3H/HeJBir); de pathologie ontwikkelt zich eveneens in bepaalde genetisch gemodificeerde muizen (knockout of transgene muizen). De mutaties die leiden tot IBD zijn vooral in cytokines en hun receptoren, in T-cel functie en in de intra-intestinale epitheliale barrière functie van de darm. Transfer van een subpopulatie van een bepaald celtype in immuundeficiënte muizen (bv. CD45RB^{hi} in RAG^{-/-}) en tenslotte toediening van exogene agentia kunnen eveneens leiden tot IBD. Deze laatstgenoemde categorie van proefdieren wordt vooral gebruikt om het verband van een bepaalde behandeling en de pathogenese van de ziekte te onderzoeken (Blumberg *et al.*, 1999). Aangezien wij het effect van AGP wilden bestuderen op de pathologie werd gebruik gemaakt van dergelijk proefdiermodel, en meer bepaald het DSS-model. DSS (dextraan natriumsulfaat) is een gesulfateerd polysaccharide dat, wanneer oraal toegediend in een bepaalde concentratie, kan leiden tot een acute of een chronische vorm van ulceratieve colitis, afhankelijk van het regime van toediening. De reden waarom voor het DSS-model gekozen werd is omdat het heel reproduceerbare resultaten geeft, gemakkelijk toe te dienen is (gewoon oplossen in het drinkwater), vlug tot resultaten leidt (althans in het acute DSS-model), en zowel een chronische als een acute vorm van colitis kan opgewekt worden (Okayasu *et al.*, 1990).



Figuur 1.12: Voorstelling van een doorsnede van een normaal colon. De bovenste laag bestaat uit epitheelcellen. Deze epitheelcellen bevinden zich aan de buitenrand van de cryptes van Lieberkühn. In deze cryptes bevinden zich de slijmbekercellen die instaan voor de productie van mucus. De ruimte tussen de cryptes is de *Lamina propria* en deze strekt zich uit tot de *Muscularis mucosae*, waaronder zich het submucosa bevindt.

I.5.3. TNF- en LPS-gemedieerde letale shock

De 2 laatste modellen die hier beschreven worden zijn in bepaalde opzichten verwant met elkaar. Lipopolysaccharide (LPS) maakt een belangrijk deel uit van de celwand van Gram-negatieve bacteriën en is in staat monocyten en macrofagen te activeren. Geactiveerde macrofagen zullen verscheidene pro-inflammatoire cytokines vrijstellen, zoals TNF, IL-6 en IL-12, die bij overproductie leiden tot ernstige systemische inflammatie, resulterend in shock. LPS-geïnduceerde shock gaat gepaard met een hoog sterftecijfer. Aanvankelijk werd aangenomen dat TNF de centrale mediator was van het LPS-geïnduceerde shocksyndroom, omdat injectie van TNF in proefdieren eveneens leidt tot een systemische inflammatoire respons, die vergelijkbaar is met deze na LPS-injectie (Tracey *et al.*, 1986). Neutralisatie van TNF bood bovendien bescherming tegen LPS in muizen (Beutler *et al.*, 1985) en tegen een bacteriële infectie in apen (Tracey *et al.*, 1987). Meer recente experimenten hebben echter uitgewezen dat LPS letaliteit ook onafhankelijk van TNF kan verlopen. De meest overtuigende argumenten daarvoor zijn afkomstig van de TNF-deficiënte muizen, die nog steeds gevoelig zijn voor hoge dosissen LPS (Amiot *et al.*, 1997; Marino *et al.*, 1997). De muizen zijn echter wel beschermd tegen lage dosissen LPS in combinatie met Galactosamine (GalN) (Marino *et al.*, 1997). In extreme gevallen (injectie van een hoge dosis LPS) is er dus blijkbaar een omweg mogelijk van de TNF-geïnduceerde systemische toxiciteit (Rothe *et al.*, 1995). TNF en LPS toediening leiden beide tot het zogenaamde systemisch inflammatoir respons syndroom (SIRS). Onder SIRS wordt verstaan: patiënten die aan twee of meer van de volgende criteria voldoen: (i) temperatuur > 38°C of < 36°C (ii) > 90 hartslagen/ minuut (iii) ademhaling: > 20/min of PaCO₂ < 32 mm Hg en (iv) aantal leukocyten > 12.000/mm³, < 4.000/mm³ of > 10% immature cellen (definitie volgens 'the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference', 1992). De voornaamste systemische effecten die daarbij optreden zijn bloeddrukdaling en orgaanfalen. De bloeddrukdaling is vooral te wijten aan de inductie van NO. NO is een natuurlijk voorkomend vasodilaterend agens en kleine hoeveelheden ervan zijn noodzakelijk om de vasculaire spanning te behouden. Het wordt geproduceerd uit L-arginine door het constitutief NO-synthase (cNOS) in de endotheelcellen. Het NO diffundeert naar de gladde spiercellen, activeert er oplosbaar guanylaat cyclase (sGC) dat cGMP aanmaakt. Dit zal op zijn beurt een cGMP afhankelijk proteïne kinase activeren wat uiteindelijk resulteert in de relaxatie van de gladde spiercellen. Tijdens SIRS echter zullen verscheidene mediators, waaronder cytokines (TNF) en endotoxines, het induceerbaar NOS (iNOS) activeren zodat massale hoeveelheden NO aangemaakt worden en zorgen voor een sterke bloeddrukdaling. Er is echter ook een gelijktijdige vrijstelling van vasoconstricterende agentia, zoals tromboxanen. De mate van verandering in de vasculaire spanning tijdens SIRS is dus het gevolg van een onevenwicht tussen de aanmaak van vasodilaterende en vasoconstricterende agentia (Vincent, 1998). Orgaanfalen is vooral het

gevolg van algemene intravasculaire coagulatie (DIC). DIC is een toestand waarbij zowel het coagulatiesysteem als de fibrinolyse systemisch geactiveerd worden. Activatie van het coagulatiesysteem is vooral het gevolg van de expressie van weefsel factor (TF) door endotheelcellen die door TNF gestimuleerd worden. TF activeert de extrinsieke coagulatiecascade. Dit leidt tot de vorming van thrombine, resulterend in de omzetting van fibrinogeen tot fibrine. Het fibrine kan tegelijkertijd afgebroken worden door activatie van het fibrinolytisch systeem dat verantwoordelijk is voor de aanmaak van plasmine. Tijdens SIRS is het fibrinolytisch systeem echter minder actief dan het coagulatiesysteem, wat resulteert in de afzetting van fibrine klonters in de microcirculatie. Daardoor zal de doorbloeding van weefsels en organen bemoeilijkt worden, met als gevolg orgaanfalen (Mammen, 1998). Gezien de complexiteit van SIRS, wordt er op verschillende vlakken geprobeerd om de letale effecten tegen te gaan. De voor de hand liggende therapie met anti-TNF antilichamen leverde geen positieve resultaten op (Read, 1998). Gezien de acute fase respons een intrinsiek beschermende functie heeft tijdens een inflammatoire respons, werd door ons nagegaan wat het effect is van bepaalde acute fase proteïnen in beide modellen.

HOOFDSTUK II - ONDERZOEK NAAR DE ROL VAN α_1 -ZUUR GLYCOPROTEINE IN NIET SPECIFIEKE RESISTENTIE TEGEN INFECTIE

II.1. INLEIDING

Niet Specifieke Resistentie tegen Infectie (NSRI) is een endogeen beschermingsmechanisme dat bij alle zoogdieren voorkomt en deel uitmaakt van ons aangeboren immuunsysteem. De aspecificiteit van de bescherming wordt geïllustreerd door het feit dat endotoxines van Gram-negatieve bacteriën bescherming kunnen bieden tegen letaliteit veroorzaakt door een antigenisch totaal onverwant organisme zoals *Candida albicans*. Dit impliceert de betrokkenheid van een 'breed-spectrum' endogeen beschermingsmechanisme. Het meest gekend en bestudeerd is de acute fase reactie, die als taak heeft de inflammatoire respons, veroorzaakt door een infectie, trauma, chirurgie, e.a. lokaal te houden en weefselschade zoveel mogelijk te vermijden. Het voornaamste kenmerk van de acute fase respons is de verandering in concentratie van een aantal serumeiwitten, gesynthetiseerd door de lever, de zogenaamde acute fase eiwitten. Een aantal van deze eiwitten hebben een duidelijke functie tijdens inflammatie (bv. C-reactief proteïne bindt micro-organismen, waardoor deze kunnen geopsoniseerd worden). Van een aantal acute fase eiwitten is de functie echter nog niet gekend. Eén daarvan is α_1 -zuur glycoproteïne (AGP), een zwaar geglycosyleerd eiwit waarvan de concentratie tijdens een acute fase respons 2-5 maal stijgt. In dit hoofdstuk werd nagegaan of AGP betrokken is in NSRI.

II.2. RESULTATEN: 'INVOLVEMENT OF THE ACUTE PHASE PROTEIN α_1 -ACID GLYCOPROTEIN IN NONSPECIFIC RESISTANCE TO A LETHAL GRAM-NEGATIVE INFECTION'

Tino Hochepped, Wim Van Molle, Franklin G. Berger, Heinz Baumann, and Claude Libert.
J Biol Chem 275:14903-14909, 2000

Involvement of the Acute Phase Protein α_1 -Acid Glycoprotein in Nonspecific Resistance to a Lethal Gram-negative Infection*

Received for publication, January 6, 2000, and in revised form, February 16, 2000

Tino Hochepeid^{‡§}, Wim Van Molle^{‡¶}, Franklin G. Berger^{||}, Heinz Baumann^{**}, and Claude Libert^{‡‡}

From the [‡]Department of Molecular Biology, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology and University of Ghent, 9000 Ghent, Belgium, the ^{||}Department of Biological Sciences, University of South Carolina, Columbia, South Carolina 29208, and the ^{**}Department of Molecular and Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York 14263

Resistance to Gram-negative infection can be induced by pretreating animals with several agents such as turpentine and interleukin (IL)-1. Because these agents are powerful inducers of acute phase proteins, we wondered whether these proteins, more particularly α_1 -acid glycoprotein (α_1 -AGP), are involved in nonspecific resistance to infection. Turpentine and IL-1 protect completely against a lethal challenge of *Klebsiella pneumoniae* when given 48 and 12–48 h before the challenge, respectively. α_1 -AGP induction in the serum reached peak values 48 h after turpentine and 12–48 h after IL-1 injection. Administration of α_1 -AGP, 2 h before a challenge of *K. pneumoniae*, significantly increased the survival. Numbers of bacteria cultured from blood and organs were significantly lower in mice pretreated with a protective dose of turpentine, IL-1, or α_1 -AGP. These data suggest that α_1 -AGP is a possible mediator in turpentine- or IL-1-induced protection because time points of maximal induction of α_1 -AGP by turpentine or IL-1 and of optimal protection by α_1 -AGP coincide. Transgenic overexpression of rat α_1 -AGP protected mice from a *K. pneumoniae* infection. Bacterial counts in blood and organs were significantly lower in transgenic mice, and only in control mice were large necrotic areas, apoptosis, and blood clots observed in the spleen. Our data suggest that α_1 -AGP prevents Gram-negative infections and may be an essential component in nonspecific resistance to infection.

Septic shock, or systemic inflammatory response syndrome, is characterized by inadequate tissue perfusion. It is caused by an overwhelming infection (1), and several bacterial organisms have been identified to induce that syndrome (2). The disease is accompanied by a high death rate, exceeding 50%, depending on the type of organism involved. Treatment with antibiotics has proven to be effective, but because bacteria are becoming increasingly resistant to antibiotics, alternative solutions have to be found. One possibility is to identify endogenous molecules

that are involved in increasing nonspecific resistance to infection and to evaluate their therapeutic use. The natural resistance of the host to infection can be increased by injection of various substances, most of which are of bacterial origin, such as lipopolysaccharide and muramyl peptides (3–5). However, because of their toxicity, these immunomodulatory substances cannot be used therapeutically in humans. Substances that increase nonspecific resistance are able to stimulate mononuclear phagocytes to secrete interleukin (IL)-1¹ and tumor necrosis factor (TNF) (6). It was demonstrated that IL-1, and to a lesser extent TNF, are able to induce natural resistance to infection (7–12). However, resistance can only be induced if certain time intervals are respected. For example, bacillus Calmette-Guérin has to be administered 2 weeks, lipopolysaccharide between 6 and 48 h, and IL-1 24 h prior to a lethal challenge of *Klebsiella pneumoniae* (4). To study septic shock, a lethal infection of *K. pneumoniae* is a relevant model because these Gram-negative bacteria were recognized, besides *Escherichia coli*, *Proteus*, *Pseudomonas* and *Serratia*, as some of the most frequent culture isolates (13).

α_1 -Acid glycoprotein (α_1 -AGP) is a highly glycosylated protein of 43 kDa with a pI of 2.7 (14). It is an acute phase protein in all mammals investigated so far (15). α_1 -AGP is produced mainly in the liver (16), although also some extrahepatic synthesis has been reported (17–19). In mouse serum, α_1 -AGP is normally found at a concentration of 0.2–0.4 mg/ml (20). During an acute phase condition, the concentration rises 2–5 times, making it one of the predominant proteins in the serum (14). Like most acute phase proteins, α_1 -AGP is induced both by cytokines and corticosteroids (21). IL-6 and IL-1 have proven to be very powerful inducers of α_1 -AGP both *in vitro* and *in vivo* (22). Although α_1 -AGP is an abundant protein, its real physiological significance is not fully understood. Inhibition of platelet aggregation (23) and of neutrophil function (24, 25) have been reported. Also, α_1 -AGP was found to inhibit selectively the transport of molecules through the endothelial layer (26, 27). *In vivo* protective effects of α_1 -AGP have been described (28–30).

We were interested in finding whether acute phase proteins are involved in nonspecific resistance to infection against *K. pneumoniae*. Therefore we studied the possible protection by turpentine oil and IL-1, two well known and very strong inducers of the acute phase response (31–34), and by α_1 -AGP itself, and we compared the kinetics of induction of α_1 -AGP in the serum and of optimal protection against *K. pneumoniae*.

We describe that α_1 -AGP significantly protects against a lethal infection with *K. pneumoniae*. This activity of the acute

* This work was supported in part by the Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek-Vlaanderen Grant G023698N Algemene Spaar en Lijfrentekas and the Interuniversitaire Attractiepolen. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

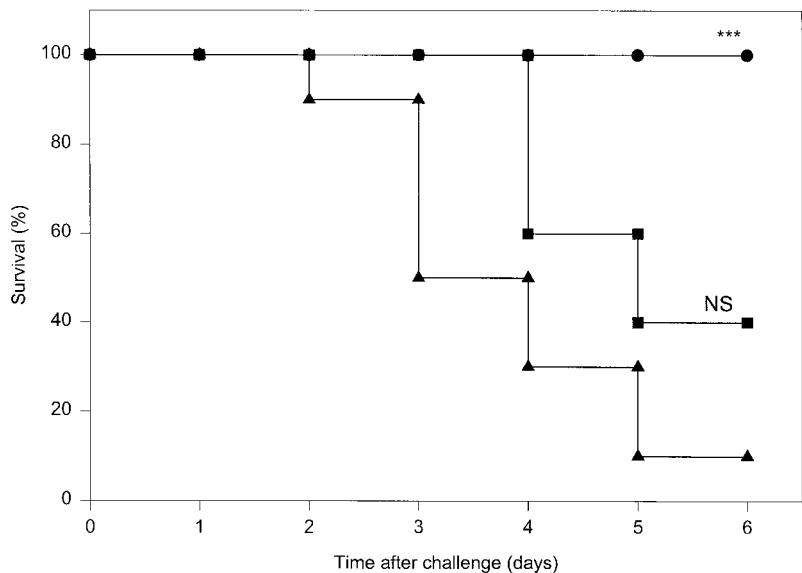
§ Fellow with the Vlaams Instituut voor de Bevordering van het Wetenschappelijk-technologisch Onderzoek in de Industrie.

¶ Postdoctoral researcher with the Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek-Vlaanderen.

‡‡ To whom correspondence should be addressed: Dept. of Molecular Biology, K. L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Ghent, Belgium. Tel.: 32-9264-8770; Fax: 32-9264-5348; E-mail: claude@dmb.rug.ac.be.

¹ The abbreviations used are: IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; α_1 -AGP, α_1 -acid glycoprotein; wt, wild-type; PBS, phosphate-buffered saline; BSA, bovine serum albumin; CFU, colony-forming units.

FIG. 1. Time dependence of turpentine-induced protection against a lethal injection of *K. pneumoniae*. Turpentine was given subcutaneously 48 h (●) or 24 h (■) before a lethal challenge of 10^6 CFU of *K. pneumoniae* ($n = 5$). $n = 10$ for control mice (▲). NS, not significant. ***, $p < 0.001$.



phase protein was observed in normal mice using purified α_1 -AGP as well as in transgenic mice that overexpress rat α_1 -AGP.

MATERIALS AND METHODS

Animals—Female C57BL/6 mice (Iffa-Credo, Saint Germain-sur-l'Arbresle, France) were used at the age of 8–12 weeks. Rat α_1 -AGP transgenic mice were generated and described previously (35). They were generated by injecting genomic DNA into (C57BL/6 \times DBA/2)F1 zygotes, and the resulting transgenic mice were back-crossed eight generations into a C57BL/6 background. Heterozygous transgenic mice from the line 9.5–5 constitutively produce about 2 mg/ml α_1 -AGP. This is 10-fold more than wild-type (wt) animals. The colony was propagated by breeding heterozygous transgenic mice with C57BL/6 female mice; the offspring, containing heterozygous transgenics and wt littermates, was genotyped at weaning age by enzyme-linked immunosorbent assay. 100 μ l of blood was collected by retro-orbital bleeding, after which serum was prepared. α_1 -AGP was purified by phenol extraction (36) and coated on the bottom of an enzyme-linked immunosorbent assay plate. After washing, rat α_1 -AGP was detected using an anti-rat α_1 -AGP polyclonal antibody (generated by H. Baumann in rabbits) (1/1,000) and an anti-rabbit antibody, conjugated to alkaline phosphatase (Sigma, St. Louis, MO; 1/5,000). The anti-rat α_1 -AGP antibody did not cross-react with mouse α_1 -AGP. About 50% of the offspring were heterozygous transgenic. Only female mice of 8–12 weeks were used in the experiments. Both transgenic and control (nontransgenic littermate) mice had comparable body weights. Mice were kept in a conventional, air-conditioned mouse room in 12-h light-dark cycles and received food and water *ad libitum*.

Injections—Intraperitoneal injections had a volume of 0.5 ml. The reagents were diluted in pyrogen-free phosphate-buffered saline (PBS) immediately before injection. Mice were injected intramuscularly with bacteria (right thigh) in a volume of 100 μ l. Mice were bled by retro-orbital bleeding or heart puncture under ether or tribromoethanol (160 mg/kg) anesthesia, respectively, and serum was prepared by clotting 30 min at 37 $^{\circ}$ C, removal of the clot, and centrifugation (15 min at 15,000 \times g).

Reagents—Bovine α_1 -AGP, bovine serum albumin (BSA), alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG, and *p*-nitrophenyl phosphate were obtained from Sigma. The α_1 -AGP preparations contained 10 ng of endotoxin/mg of protein. α_1 -AGP was >99% pure as mentioned by the manufacturer and as judged by polyacrylamide gel electrophoresis and subsequent Coomassie Blue staining. Recombinant mouse IL-1 β was expressed in and purified from *E. coli* in our laboratory, had a specific activity of 3.65×10^8 units/mg, and contained less than 10 ng of endotoxin/mg of protein.

Infection Model—*K. pneumoniae* (ATCC 43816), a strain that produces a lethal infection in normal mice (9), was inoculated in the right thigh muscle as described (37). An inoculum of 1×10^6 CFU/mouse was used except in the studies with rat α_1 -AGP transgenic mice, where we used 10^5 CFU/mouse. Survival was scored over a period of at least 5 days.

Clearance of Bacteria—36 h after injection of *K. pneumoniae*, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of tribromoethanol. Blood was taken by heart puncture. For preparation of plasma, 450 μ l of blood was added to 50 μ l of sodium citrate (0.1 M). Immediately thereafter, mice were killed by cervical dislocation. Then, mice were perfused with 10 ml of a 0.9% NaCl solution to wash out the blood. The liver, spleen, and kidney were removed aseptically, weighed, and homogenized mechanically in sterile saline. For homogenization, the liver was diluted (w/v) 2-fold; spleen and kidney were diluted 10-fold. The suspensions were diluted and plated out on sterile nutrient agar. After overnight incubation at 37 $^{\circ}$ C, CFU numbers were counted.

Measurement of α_1 -AGP—The concentration of α_1 -AGP in mouse serum was measured using a home-developed sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. A rat monoclonal antibody was coated (0.1 μ g/ml) on 96-well Maxisorb plates. After blocking with 1% BSA and PBS, samples and a murine α_1 -AGP standard were titrated, after which the plates were incubated for 1 h at 37 $^{\circ}$ C. A rabbit polyclonal antiserum (1/1,000) and subsequent alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit antibody (1/5,000) were used as secondary and third antibody. Human α_1 -AGP was measured by nephelometry using a goat anti-human α_1 -AGP polyclonal antibody.

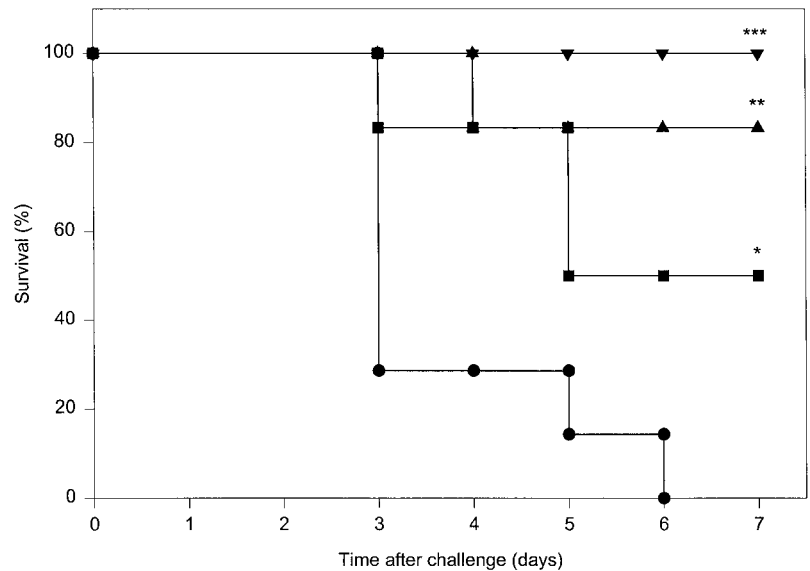
Statistical Analysis—Survival was scored and evaluated using a log rank test. Final lethality was scored using a χ^2 test. The statistical significance of the number of bacterial colonies in the blood and the organs, as well as of induction of α_1 -AGP after injection of IL-1 or turpentine, was determined using a Dunnett analysis of variance test. $p < 0.05$ was considered statistically significant. *, **, and *** represent $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively.

RESULTS

Protective Effect of Turpentine against a Lethal Infection with *K. pneumoniae*—To investigate whether turpentine conferred protection, mice were pretreated with 100 μ l of turpentine subcutaneously 24 or 48 h before a lethal bacterial challenge (10^6 CFU unless otherwise stated) of *K. pneumoniae*. When turpentine was given 48 h before the challenge, mice were significantly ($p < 0.0001$) protected *versus* PBS-pretreated controls. In contrast, turpentine treatment 24 h before the challenge was unable to induce significant protection ($p = 0.1137$; not significant). Mice were observed for 6 days, after which no further deaths occurred (Fig. 1).

Protective Effect of IL-1 to a Lethal Infection with *K. pneumoniae*—To determine the time point of optimal protection by IL-1, 1 μ g of IL-1 was given at 12, 24, and 48 h before the lethal challenge (Fig. 2). IL-1 protected significantly when given 48 h ($p = 0.0279$), 24 h ($p = 0.0020$), or 12 h ($p < 0.0001$) prior to the challenge, compared with PBS-pretreated controls. IL-1 protected significantly better at -12 h compared with -48 h ($p = 0.0455$).

FIG. 2. Protection of 1 μ g of IL-1 against a lethal challenge of *K. pneumoniae*. IL-1 was given intraperitoneally at different time points (■, 48 h; ▲, 24 h; and ▼, 12 h) prior to a lethal injection with 10^6 CFU of *K. pneumoniae*. Control mice (●) received saline ($n = 6$) for all groups, except for the control group ($n = 7$). *, **, ***, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively.



Induction of α_1 -AGP by Turpentine or IL-1—To study the kinetics of induction of α_1 -AGP by turpentine or IL-1, mice were injected subcutaneously with 100 μ l of turpentine or intraperitoneally with 1 μ g of IL-1. At different time points after the injection, mice were sacrificed, and serum was collected. The concentration of α_1 -AGP in the serum was measured as described under “Materials and Methods.” The α_1 -AGP levels in the serum were induced significantly 48 h ($p < 0.01$) and 72 h ($p < 0.01$) after turpentine injection compared with the basal levels (PBS injected mice had no increased α_1 -AGP at any time point) and 12 h ($p < 0.01$), 24 h ($p < 0.01$), and 48 h ($p < 0.05$) after IL-1 injection. The levels after 12 h were significantly higher than those after 48 h ($p = 0.0455$). The α_1 -AGP levels 144 h after turpentine or IL-1 injection had reached basal levels again ($p > 0.05$; not significant) (Fig. 3).

Protection of α_1 -AGP against a Lethal Bacterial Challenge—To test whether α_1 -AGP was able to protect, several doses were injected intraperitoneally 2 h before and/or 24 h after a lethal challenge with *K. pneumoniae*. When mice were treated with 10 mg of α_1 -AGP 2 h before the lethal challenge or with 10 mg of α_1 -AGP spread over two injections (5 mg 2 h before and 5 mg 24 h after the lethal challenge), significant protection was observed ($p = 0.0094$ and $p = 0.0006$, respectively) compared with the control mice that received PBS as pretreatment (Fig. 4). When mice were given a total dose of 5 mg, protection was only marginal, whereas a dose of 2 mg did not protect. Furthermore, pretreatment with α_1 -AGP proved to be necessary because mice treated with 10 mg of α_1 -AGP 24 h after the lethal challenge were not protected (data not shown).

In a separate experiment (Table I), we observed that 10 mg of BSA was not able to protect against 10^5 CFU of *K. pneumoniae*, which illustrates the specificity of the effect of α_1 -AGP.

To compare the serum levels of α_1 -AGP induced by turpentine or IL-1 on the one hand and those after injection of 10 mg of α_1 -AGP on the other hand, we performed the experiment shown in Table II. Mice were injected with 10 mg of human α_1 -AGP, and α_1 -AGP was measured in the blood after 2, 8, 24, 48, and 72 h. It was found that, taking into account a blood volume of 2 ml and a serum volume of 1 ml, 2 h after injection 2.3 mg of α_1 -AGP/ml of serum was present, which is comparable with the amounts found after injection with turpentine or IL-1 (Fig. 3).

Spread of *K. pneumoniae* in Blood and Different Organs—To shed light on the mechanism of protection against a lethal challenge with *K. pneumoniae*, we studied the number of bac-

teria in the blood and in different organs. Mice received either 10 mg of α_1 -AGP (5 mg at 2 h before and 5 mg at 24 h after the lethal challenge), 1 μ g of IL-1 24 h before the lethal challenge, or 100 μ l of turpentine 48 h before the lethal challenge. Mice treated with α_1 -AGP, IL-1, or turpentine showed significantly less bacteria in the blood ($p < 0.001$, $p = 0.0087$, and $p = 0.0021$, respectively), liver ($p = 0.0058$, $p = 0.0038$, and $p = 0.0038$, respectively), spleen ($p = 0.0021$, $p = 0.0135$, and $p = 0.0010$, respectively), and kidney ($p = 0.0079$, $p = 0.0312$, and $p = 0.0046$, respectively) compared with control mice 36 h after an intramuscular injection of 1×10^6 CFU of *K. pneumoniae* (Fig. 5). These data suggest that the mechanism of protection by all of these agents could be at the same level and that α_1 -AGP may mediate both the IL-1 and turpentine effects. It is also clear from Fig. 5 that turpentine, which induces higher amounts of α_1 -AGP than IL-1, is better in reducing the spread of bacteria.

It has already been shown that IL-1 is not directly cytotoxic to bacteria (9). We have tested the effect of α_1 -AGP by plating out bacteria on nutrient agar plates containing different concentrations of α_1 -AGP (1.5, 0.5, 0.15 mg/ml or none). We found no difference in the number of bacteria grown in the presence or absence of α_1 -AGP (data not shown).

Lethal Response of Rat- α_1 -AGP Transgenic Mice—A challenge of 10^5 bacteria results in almost 100% lethality over a period of 2 weeks. When heterozygous α_1 -AGP transgenic mice and wt littermates were challenged with bacteria, the transgenic mice were significantly protected compared with the wt littermates (Fig. 6). The constitutive α_1 -AGP levels in these heterozygous transgenic mice amount to 2 mg/ml (38). This result was reproduced four times. Control mice started dying at day 2 and transgenic mice at day 5. Eventually, 83% control mice and 39% transgenic mice succumbed ($p = 0.0002$). At a higher inoculum, protection by the transgenic α_1 -AGP was no longer observed (data not shown).

Bacterial Clearance in Rat- α_1 -AGP Transgenic and Control Mice—As described before, 24–48 h after challenge, bacteria are found in most organs (9), most pronounced in the spleen (39). We injected α_1 -AGP transgenic mice and control littermates and counted the bacteria in blood, spleen, liver, and kidney 36 h later. The numbers of CFU are expressed per g of tissue (Fig. 7). We found that in the blood, spleen, liver, and kidney, α_1 -AGP transgenic mice had significantly several 100-fold less invasion of bacteria ($p = 0.0432$, $p = 0.0033$, $p = 0.0437$, and $p = 0.0256$, respectively).

FIG. 3. Induction of α_1 -AGP in mouse serum after turpentine or IL-1 injection. 0.1 ml of turpentine (\blacktriangle) was injected subcutaneously in five groups of mice ($n = 6$). 12, 24, 48, 72, and 144 h after the injection, mice were sacrificed, serum was collected, and the concentration of α_1 -AGP was determined. In another five groups of mice, 1 μ g of IL-1 (\bullet) was injected intraperitoneally. At 6 ($n = 3$), 12 ($n = 5$), 24 ($n = 5$), 48 ($n = 3$), and 144 h ($n = 3$) after the injection, mice were sacrificed, serum was collected, and the concentration of α_1 -AGP was determined. 1 ml of PBS (\blacksquare) was injected in seven groups of mice ($n = 3$). 0, 6, 12, 24, 48, and 144 h later, mice were sacrificed, serum was collected, and the concentration of α_1 -AGP was determined. NS, not significant. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

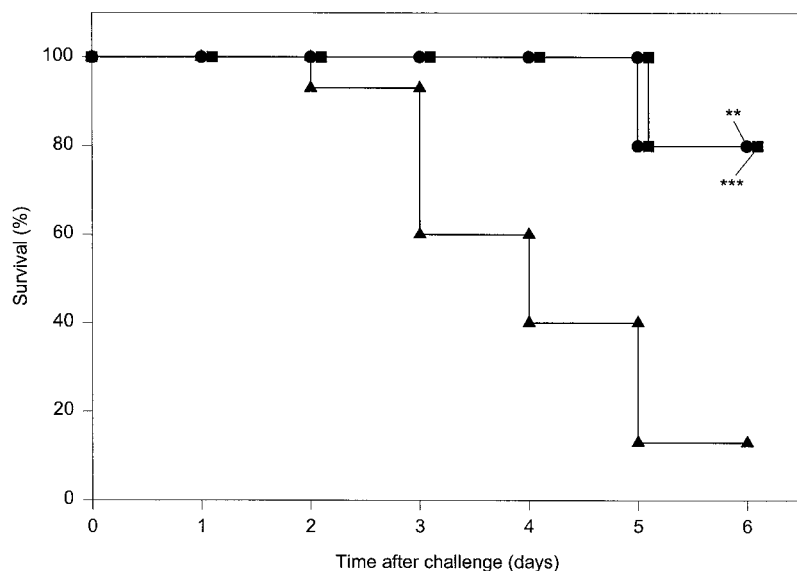
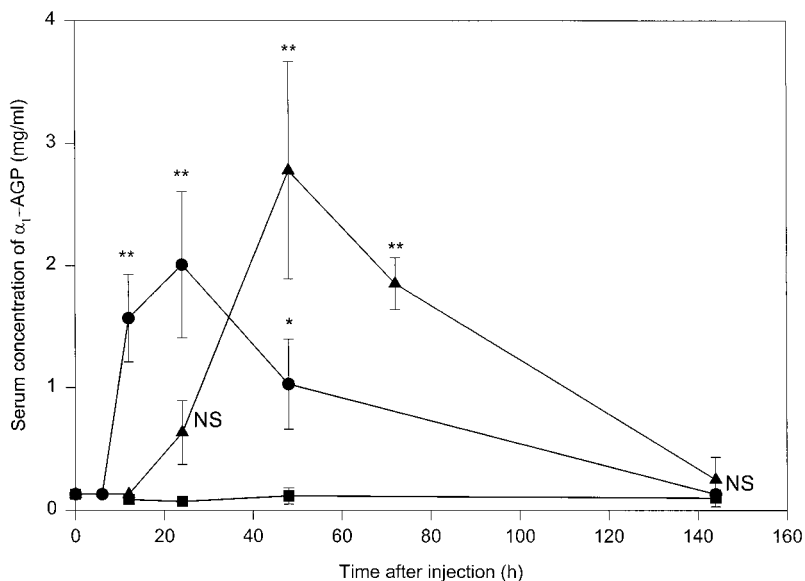


FIG. 4. Protective effect of bovine α_1 -AGP against a lethal injection of *K. pneumoniae*. 10 mg of α_1 -AGP was given intraperitoneally 2 h before (\bullet) the challenge with 10^6 CFU of *K. pneumoniae* ($n = 5$). Two doses of 5 mg of α_1 -AGP were given 2 h before and 24 h after (\blacksquare) the challenge ($n = 10$). Controls (\blacktriangle) received saline as pretreatment ($n = 15$), ** $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

TABLE I

Protection by α_1 -AGP and lack of protection by BSA against a lethal infection of *K. pneumoniae*

Pretreatment ^a	Lethal response ^b
PBS	4/5
BSA	3/5 ^c
α_1 -AGP ^d	1/10 ^e

^a BSA or α_1 -AGP was given at -2 h (5 mg) and at $+24$ h (5 mg) intraperitoneally relative to challenge with 10^6 CFU of *K. pneumoniae* (intramuscularly).

^b Scored at day 6 (no further deaths occurred). Statistical significance was calculated versus the PBS group.

^c Not significant ($p = 0.4902$).

^d The group that received α_1 -AGP was significantly protected versus the group that received BSA ($p = 0.00195$).

^e $p = 0.0034$.

Necrosis in Splens of Rat α_1 -AGP Transgenic and Control Mice—2 days after a challenge of 10^5 *K. pneumoniae*, transgenic as well as control mice were sacrificed and their tissues fixed. Tissue sections revealed that mainly the spleen of control mice was heavily damaged (Fig. 8). In these mice, massive influx of bacteria was observed, along with erythrocytes. Also, large necrotic areas, apoptosis and blood clots were found.

TABLE II

Blood concentration of α_1 -AGP after injection of 10 mg of human α_1 -AGP

Time after injection ^a	Blood concentration
<i>h</i>	<i>mg/ml</i>
0	10 ± 0
2	4.675 ± 0.125
8	2.73 ± 0.15
24	1.21 ± 0.141
48	0.61 ± 0.05
72	0.34 ± 0.05

^a Injected intraperitoneally ($n = 3$).

α_1 -AGP-transgenic mice were completely protected from these lesions (Fig. 8).

DISCUSSION

Septic shock is the result of an overwhelming Gram-negative bacterial infection (1). The bacteria and/or their lipopolysaccharides are found in the circulation, and shock is the result of the combined action of several proinflammatory cytokines induced in macrophages and other cells (40). Septic shock and sepsis, leading to cardiovascular depression and multiple organ failure, are causing more than 100,000 casualties per year in the

FIG. 5. Counts of colonies of *K. pneumoniae* in the blood, spleen, liver, and kidney of mice 36 h after an intramuscular injection of 10^6 CFU of *K. pneumoniae*. Each bar represents the mean \pm S.D. of log CFU/ml of homogenized tissue from three mice; *p* values are versus controls that received saline. *, *p* < 0.05, **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001.

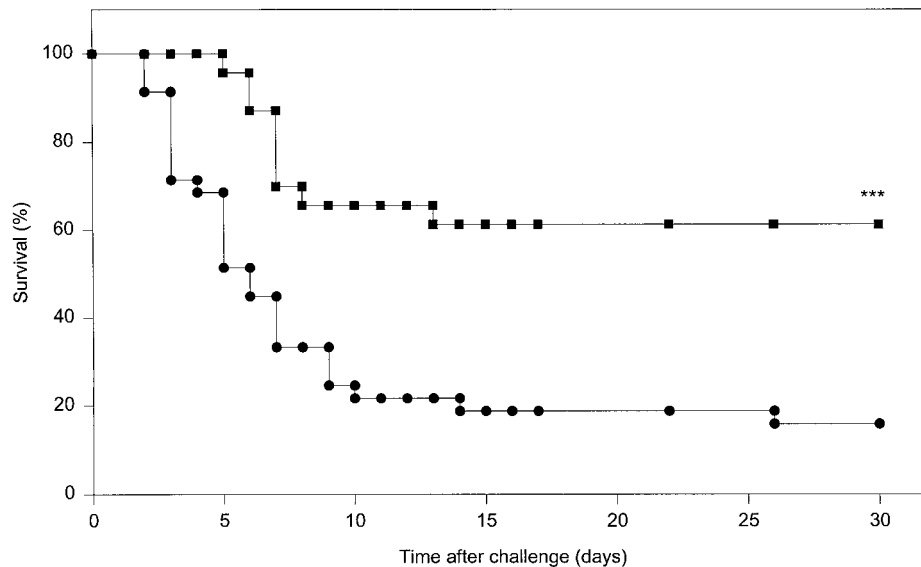
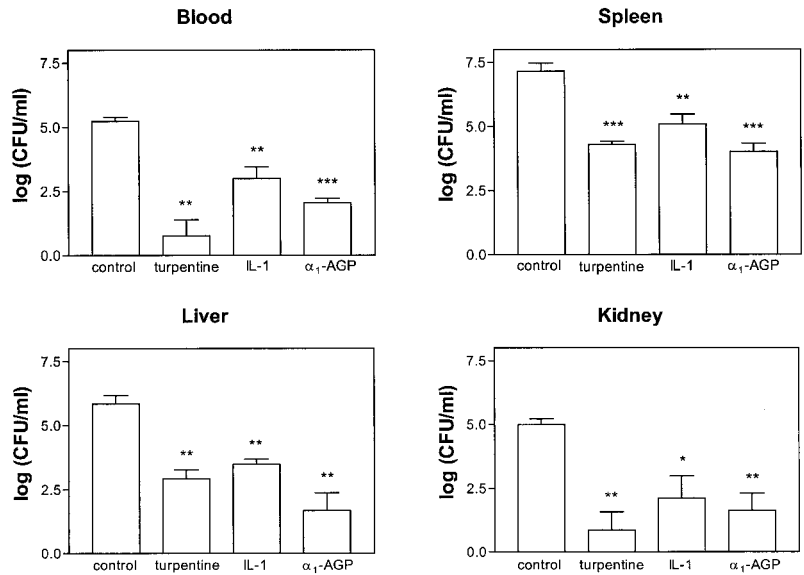


FIG. 6. Kaplan-Meier plot of lethal response of α_1 -AGP transgenic mice (■) (*n* = 23) and wt littermates (●) (*n* = 35) to 10^5 CFU of *K. pneumoniae*. Lethality was scored daily for 1 month after the intramuscular inoculation. No further deaths occurred. ***, *p* < 0.001.

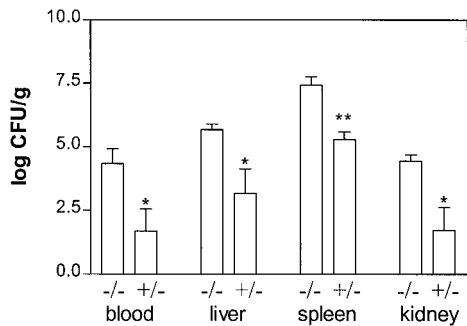


FIG. 7. Bacterial counts in the tissues of wt mice (*n* = 4) and rat α_1 -AGP transgenic mice (*n* = 4). 36 h after an intramuscular challenge with 10^5 CFU of *K. pneumoniae*, blood and tissues were collected, homogenized, and plated, after which bacteria were counted. Logarithms of the number of bacteria are expressed per g of tissue. The ratios of control mice to transgenics for blood, liver, spleen, and kidney are 440, 324, 136, and 512, respectively. *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01.

United States (41). Several clinical trials had the proinflammatory cytokines as a target: the IL-1 receptor antagonist, soluble TNF receptors, or TNF-neutralizing antibodies were used. These approaches and also those inhibiting platelet-activating factor or bradykinin were relatively disappointing (42).

Clearly new and other approaches are needed.

The toxic and lethal effects of a variety of infections or of bacterial endotoxins can be reduced by preadministration of a small dose of endotoxin 6–48 h before (4). Several other substances of natural origin or synthetic compounds based on microbial structures also increase the natural endogenous resistance mechanisms. The protective effects are clearly nonspecific because endotoxin from Gram-negative bacteria can protect against lethality caused by an antigenically unrelated organism such as *Candida albicans* (43). Therefore the phenomenon was called induction of “nonspecific resistance to infection” (11). Administered under adequate conditions, such bacterial agents markedly increase nonspecific immunity, even against strains made resistant to antibiotics (4). However, because of their toxicity, these immunomodulatory substances have not gained acceptance as a therapy in humans. Therefore, further investigation is needed to obtain a clear insight into the mechanism of induction of nonspecific immunity. Several investigators found that IL-1 plays a crucial role in inducing nonspecific resistance to infection because it can protect mice against a lethal challenge of *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *C. albicans*, and *K. pneumoniae* (7–10, 44). It was also shown that pretreatment with IL-6 or TNF could protect against a lethal bacterial challenge, although these

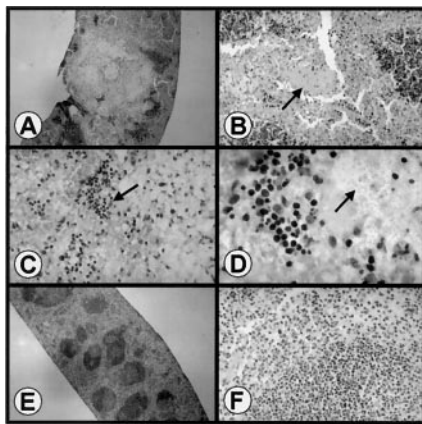


FIG. 8. Morphology of spleens of wt mice (panels A–D) and α_1 -AGP transgenic mice (panels E and F) 2 days after an intramuscular challenge of 10^5 CFU of *K. pneumoniae*. Panel A, $\times 10$; panel B, $\times 40$ (arrow shows fibrin clot); panel C, $\times 100$ (arrow shows apoptotic cell); panel D, $\times 250$ (arrow shows bacteria); panel E, $\times 10$; panel F, $\times 100$.

cytokines were clearly less potent than IL-1 (9, 44). These cytokines all play an important role in inducing the acute phase response. The acute phase response is the answer of the organism to disturbances of homeostasis caused by infection, tissue injury, or immunological disorders. It consists of a local reaction at the site of injury characterized by a number of responses, such as platelet aggregation and activation of leukocytes, which in turn release acute phase cytokines (such as TNF, IL-1, and IL-6). In addition, activated fibroblasts and endothelial cells are able to produce cytokines such as IL-6. These cytokines act on specific receptors on different target cells leading to a systemic reaction characterized by fever, leukocytosis, increase in secretion of glucocorticoids, activation of complement, and clotting and dramatic changes in the concentration of some plasma proteins called acute phase proteins (45). The acute phase response is a fundamental protective system that has evolved (21). The expression of several proteins is augmented by the liver several hours and days after the start of an infection or trauma. Most of these proteins are supposed to have protective or healing activities. The set of acute phase proteins varies from one species to another. The most predominant acute phase proteins in the mouse are serum amyloid A, serum amyloid P, and α_1 -AGP (15).

α_1 -AGP is a glycosylated protein with a molecular mass of ~ 43 kDa and a pI of 2.7 (14). Human α_1 -AGP contains five *N*-glycosylation chains (46) containing sialyl Lewis^x structures (47). It is produced mainly by hepatocytes as a response to IL-1 and IL-6 (22). During an acute phase condition the glycosylation pattern changes (48), and the serum concentration of α_1 -AGP rises up to 5-fold. Although the precise biological function of the protein is not known, most *in vitro* experiments suggest an anti-inflammatory role. It inhibits platelet aggregation (23), activation of neutrophils (24, 25), and the proliferative response of peripheral blood lymphocytes to phytohemagglutinin (49). *In vivo*, α_1 -AGP has been shown to protect against TNF-induced lethal shock and hepatitis (50).

In the present study, we have investigated the hypotheses that (i) induction of an acute phase reaction by turpentine would enhance nonspecific resistance to infection among others by inducing IL-1; and (ii) α_1 -AGP would be a mediator in turpentine- and IL-1-induced nonspecific resistance to infection in mice. This work is an extension of previous research revealing that both IL-1 and α_1 -AGP protect against a lethal injection of TNF in mice (28, 50).

We observed that injection of turpentine completely pro-

ected when it was given 48 h before a lethal challenge with *K. pneumoniae*. Because turpentine is a strong inducer of the acute phase response, we believe that induction of acute phase proteins could be responsible for the protection.

In agreement with others, we have shown that IL-1 was able to protect when it was given 24 h before a lethal challenge with *K. pneumoniae* (10). We observed that IL-1 still protected when it was given 12 or 48 h before the lethal challenge. Because IL-1 is a strong inducer of a subset of acute phase proteins, we believe that protection by IL-1 is also mediated by induction of acute phase proteins. Moreover, IL-1-induced protection has been reported to be blocked by coadministration of galactosamine, a specific hepatotoxin (51).

Furthermore, we found that α_1 -AGP, a major acute phase protein in the mouse, protects significantly when given 2 h before a lethal challenge with *K. pneumoniae*. Protection was not observed with an equal dose of another protein, BSA. To investigate whether turpentine- or IL-1-induced protection could be mediated by induction of α_1 -AGP, we measured the induction of α_1 -AGP at different time points after injection of turpentine or IL-1. Significant induction of α_1 -AGP was found 48–72 h after turpentine and 12–48 h in the case of IL-1 injection. Remarkably, the time interval between administration of turpentine (–48 h) or IL-1 (–12 or –48 h) and the lethal challenge with *K. pneumoniae* corresponded with the time needed to obtain optimal induction of α_1 -AGP in mouse serum. Moreover, we observed that turpentine pretreatment 24 h before the lethal challenge did not protect significantly. This is in agreement with the fact that no significant induction of α_1 -AGP was found 24 h after turpentine injection. Protection of IL-1 at –12 h is significantly better compared with IL-1 at –48 h. The protection data are in line with the induction data. We believe that the data can be explained quite logically: when mice are pretreated with IL-1 and challenged with bacteria 12 h later, most of the α_1 -AGP is induced during the bacterial infection. When mice are pretreated with IL-1 at 48 h prior to the challenge, then most of the α_1 -AGP has gone by the time of bacterial challenge, and only minute amounts of α_1 -AGP are present during the infection, so less protection will be observed. In that view, the intermediate protection of the –24 h group is also explained. The data suggest that a minimal exposure time to α_1 -AGP is required. Because it was described that induction of IL-1 reaches peak values 24–48 h after turpentine or IL-1 injection (53–55), we suggest that turpentine-induced protection is caused by the induction of IL-1 and ultimately, at least partially, by induction of α_1 -AGP. By studying the clearing of α_1 -AGP from the serum of mice, we found that injection of a protective dose of α_1 -AGP (10 mg) leads to serum levels at the time of challenge (2.3 mg/ml) which are comparable to those that are obtained after injection with turpentine (2.8 mg/ml) or IL-1 (2.0 mg/ml).

Because protection induced by α_1 -AGP was less impressive compared with IL-1 or turpentine, we surely cannot exclude a role for other acute phase proteins in IL-1- or turpentine-induced nonspecific resistance to infection.

To clarify the mechanism of protection, we studied the spread of bacteria in the blood and in different organs. The number of bacteria in the blood, liver, kidney, and spleen 36 h after infection with a lethal dose of *K. pneumoniae* was significantly lower when mice were pretreated with a protective dose of turpentine, IL-1, or α_1 -AGP. This result contradicts the data obtained by van der Meer *et al.* (10), who found no difference in the number of bacteria. A possible explanation for these contradictory results could be the fact that they looked at the

spread of bacteria 24 h after the lethal challenge, whereas we looked 36 h after the lethal challenge. Finally, van der Meer *et al.* (10) showed that IL-1 had no direct cytotoxic effect on *K. pneumoniae*. We obtained similar results using α_1 -AGP.

We conclude that turpentine, IL-1, and α_1 -AGP protect against a lethal challenge of *K. pneumoniae*. Because galactosamine blocks IL-1-induced protection and because the time points of optimal protection by turpentine or IL-1 and the time points of peak induction of α_1 -AGP after turpentine or IL-1 injection coincide, we argue that α_1 -AGP is a possible mediator in turpentine- and IL-1-induced protection. We also found that the number of bacteria in the blood and in different organs was reduced significantly in mice pretreated with turpentine, IL-1, or α_1 -AGP. Because we have shown that α_1 -AGP has no direct antimicrobial effect, the reduced number of bacteria in pretreated mice has to be explained by another mechanism.

Furthermore, we demonstrate that overexpression of α_1 -AGP, in mice, protects against a lethal Gram-negative infection. Heterozygous transgenic mice were back-crossed to C57BL/6 mice, and the female offspring differing only in the rat α_1 -AGP gene were used in the experiments. We found that the transgenic mice were relatively resistant in this sepsis model. The mice were significantly ($p = 0.0002$) protected. The heterozygous transgenic mice used in the experiment constitutively express 2 mg/ml α_1 -AGP/ml of serum, which is comparable with the amounts found after turpentine injection, IL-1 injection, or α_1 -AGP injection in wt animals. However, the transgenic mice repeatedly were not protected against a 10-fold higher inoculum. We also found that blood as well as tissues of the transgenic mice contained several 100-fold less bacteria than the wt littermate mice and that the spleen, the most important target organ of the bacteria, showed gross lesions associated with fibrin clots, necrosis, and apoptosis in wt littermates only.

In most experiments, bovine α_1 -AGP was used. However, human α_1 -AGP was also clearly active in our system (data not shown). The glycosylation of human and bovine α_1 -AGP consists of sialyl Lewis^x structures, and these are absent on the transgenic α_1 -AGP because it is well known that mice are unable to synthesize sialyl Lewis^x structures, based on their deficiency in α_3 -fucosyltransferase (56), an essential enzyme in the synthesis of sialyl Lewis^x structures. Clearly, transgenic α_1 -AGP is protective, so the protection is not mediated by sialyl Lewis^x structures.

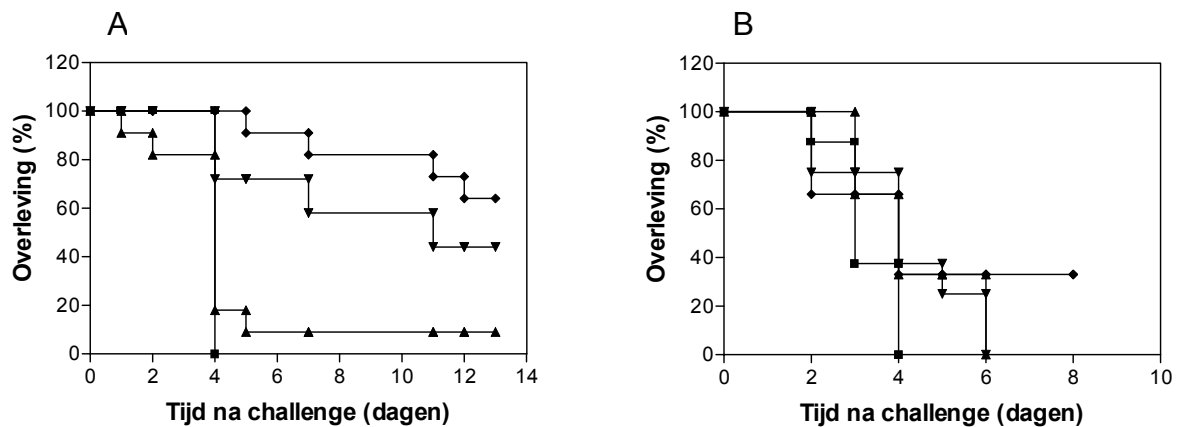
We hypothesize that the effect of α_1 -AGP is related to its effect on the endothelial cells. It was described that α_1 -AGP, to a certain degree, is able to control the transport of small and large molecules through the endothelium to the subendothelial spaces (27). We believe that this activity works in both directions, such that the invasion of the blood vessels by bacteria is prevented (to some degree) by α_1 -AGP. The reduced numbers of bacteria in the tissues support the hypothesis that this could indeed be the mechanism by which α_1 -AGP protects against lethal Gram-negative infection. We believe that our data open new possibilities for the treatment of Gram-negative bacterial infection and sepsis.

REFERENCES

- Donnelly, P. B. (1965) *Lancet* **10**, 822–823
- Petersdorf, R. G. (1977) in *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Thorn, G. W., Adams, R. D., Braunwald, E., Isselbacher, K. J., and Petersdorf, R. G., eds) pp. 770–775, McGraw-Hill Kogakusha, Tokyo
- Shilo, M. (1959) *Annu. Rev. Microbiol.* **13**, 255–278
- Parant, M., Parant, F., Chedid, L., and Minor, L. L. (1975) *Ann. Immunol.* **126**, 319–326
- Chedid, L., Parant, M., Parant, F., Lefrancier, P., Choay, J., and Lederer, E. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 2089–2093
- Parant, M. (1994) *J. Immunopharmacol.* **16**, 445–449
- Ozaki, Y., Ohashi, T., Minami, A., and Nakamura, S. (1987) *Infect. Immun.* **55**, 1436–1440
- Czuprynski, C. J., Brown, J. F., Young, K. M., Cooley, A. J., and Kurtz, R. S. (1988) *J. Immunol.* **140**, 962–968
- van der Meer, J. W. M. (1988) *Biotherapy* **1**, 19–25
- van der Meer, J. W. M., Barza, M., Wolff, S. M., and Dinarello, C. A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 1620–1623
- Dinarello, C. A., and Neta, R. (1989) *Biotherapy* **1**, 245–254
- Dinarello, C. A. (1991) *Blood* **77**, 1627–1652
- Turck, M. (1977) in *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Thorn, G. W., Adams, R. D., Braunwald, E., Isselbacher, K. J., and Petersdorf, R. G., eds) pp. 830–835, McGraw-Hill Kogakusha, Tokyo
- Schmid, K. (1975) in *The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control* (Putman, F. W., ed) pp. 183–192, Academic Press, New York
- Kushner, I., and Mackiewicz, A. (1993) in *Acute Phase Proteins: Molecular Biology, Biochemistry, and Clinical Applications* (Mackiewicz, A., Kushner, I., and Baumann, H., eds) pp. 3–19, CRC Press, Boca Raton, FL
- Sarcione, E. J. (1963) *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 516–518
- Gahmberg, C. G., and Andersson, L. C. (1978) *J. Exp. Med.* **148**, 507–521
- Eap, C. B., Baumann, P., and Moretta, A. (1989) *Experientia (Basel)* **45**, 52 (abstr.)
- Sörensen, J., Matejka, G. L., Ohlson, M., and Haraldsson, B. (1999) *Am. J. Physiol.* **276**, H530–H534
- Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H., and Köhler, G. (1994) *Nature* **368**, 339–342
- Baumann, H., and Gaudie, J. (1994) *Immunol. Today* **15**, 74–80
- Baumann, H., Prowse, K. R., Won, K., and Marinkovic-Pajovic, S. (1993) in *Acute Phase Proteins: Molecular Biology, Biochemistry, and Clinical Applications* (Mackiewicz, A., Kushner, I., and Baumann, H., eds) pp. 409–423, CRC Press, Boca Raton, FL
- Costello, M., Fiedel, B. A., and Gewurz, H. (1979) *Nature* **281**, 677–678
- Bennett, M., and Schmid, K. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 6109–6113
- Lainé, E., Couderc, R., Roch-Arveiller, M., Vasson, M. P., Giroud, J. P., and Raichvarg, D. (1990) *Inflammation* **14**, 1–9
- Haraldsson, B., and Rippe, B. (1987) *Acta Physiol. Scand.* **129**, 127–135
- Muchitsch, E. M., Teschner, W., Linnau, Y., and Pichler, L. (1996) *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **331**, 313–321
- Libert, C., Brouckaert, P., and Fiers, W. (1994) *J. Exp. Med.* **180**, 1571–1575
- Van Molle, W., Libert, C., Fiers, W., and Brouckaert, P. (1997) *J. Immunol.* **159**, 3555–3564
- Williams, J. P., Weiser, M. R., Pechet, T. T., Kobzik, L., Moore, F. D., Jr., and Hechtman, H. B. (1997) *Am. J. Physiol.* **273**, G1031–G1035
- Baumann, H., Held, W. A., and Berger, F. G. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 566–573
- Dinarello, C. A. (1984) *N. Engl. J. Med.* **311**, 1413–1418
- Birch, H. E., and Schreiber, G. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 8077–8080
- Koj, A., Gaudie, J., and Baumann, H. (1993) in *Acute Phase Proteins: Molecular Biology, Biochemistry, and Clinical Applications* (Mackiewicz, A., Kushner, I., and Baumann, H., eds) pp. 275–287, CRC Press, Boca Raton, FL
- Dewey, M. J., Rheume, C., Berger, F. G., and Baumann, H. (1990) *J. Immunol.* **144**, 4392–4398
- Chan, J., and Yu, D. (1991) *Protein Express. Purif.* **2**, 34–36
- Kunst, M. W., Mattie, H., and van Furth, R. (1979) *Infection* **7**, 30–34
- Libert, C., Hochepeid, T., Berger, F. G., Baumann, H., Fiers, W., and Brouckaert, P. (1998) *Transgen. Res.* **7**, 1–7
- Uchiyama, J., Kuniki, H., Fujikura, Y., Fukumoto, T., and Koshiro, A. (1991) *Immunobiology* **184**, 63–74
- Galanos, C., and Freudenberg, M. A. (1993) *Immunobiology* **187**, 346–356
- Stone, R. (1994) *Science* **264**, 365–367
- Abraham, E., and Marshall, J. C. (1999) *Mol. Med. Today* **5**, 56–58
- van't Wout, J. W., van der Meer, J. W. M., Barza, M., and Dinarello, C. A. (1988) *Eur. J. Immunol.* **18**, 1143–1146
- van der Meer, J. W. M., Helle, M., and Aarden, L. (1989) *Eur. J. Immunol.* **19**, 413–416
- Richards, C., Gaudie, J., and Baumann, H. (1991) *Eur. Cytokine Netw.* **2**, 89–98
- Treuheit, M. J., Costello, C. E., and Halsall, H. B. (1992) *Biochem. J.* **283**, 105–112
- de Graaf, T. W., van der Stelt, M. E., Anbergen, M. G., and van Dijk, W. (1993) *J. Exp. Med.* **177**, 657–666
- van Dijk, W., and Mackiewicz, A. (1993) in *Acute Phase Proteins: Molecular Biology, Biochemistry, and Clinical Applications* (Mackiewicz, A., Kushner, I., and Baumann, H., eds) pp. 559–580, CRC Press, Boca Raton, FL
- Chiu, K. M., Mortensen, R. F., Osmand, A. P., and Gewurz, H. (1977) *Immunology* **32**, 997–1005
- Libert, C., Van Bladel, S., Brouckaert, P., Shaw, A., and Fiers, W. (1991) *J. Immunol.* **146**, 2625–2632
- Vogels, M. T. E., Cantoni, L., Carelli, M., Sironi, M., Ghezzi, P., and van der Meer, J. W. M. (1993) *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 2527–2533
- Gershenwald, J. E., Fong, Y. M., Fahey, T. J., Calvano, S. E., Chizzonite, R., Kilian, F. L., Lowry, S. F., and Moldawer, L. L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4966–4970
- Oldenburg, H. S. A., Pruijt, J. H., Lazarus, D. D., Rogy, M. A., Chizzonite, R., Lowry, S. F., and Moldawer, L. L. (1995) *Cytokine* **7**, 510–516
- Vogels, M. T. E., Eling, W. M. C., Otten, A., and van der Meer, J. W. M. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1744–1747
- Leon, L., Conn, C. A., Glaccum, M., and Kluger, M. J. (1996) *Am. J. Physiol.* **271**, R1668–R1675
- Havenaar, E. C. C., Hoff, R. C., van den Eijnden, D. H., and van Dijk, W. *Glycoconjugate J.* **15**, 389–395

II.3. BETROKKENHEID VAN ANDERE ACUTE FASE EIWITTEN IN NSRI

Naast de rol van AGP tijdens NSRI, werd ook de eventuele rol van een aantal andere acute fase proteïnen nagegaan. De acute fase eiwitten die getest werden zijn serum amyloid P (SAP) en haptoglobine (Hp). In hoofdstuk IV komt ook nog α_2 -macroglobuline aan bod. De betrokkenheid van deze AFP's werd getest door een letale dosis bacteriën (10^5 en 10^4 CFU bij de SAP-muizen en 10^4 en 10^3 CFU bij de Hp-muizen) intramusculair toe te dienen aan muizen die deficiënt zijn voor elk van deze eiwitten respectievelijk en de overleving te registreren (figuur II.1).



Figuur II.1: (A) Overleving van SAP-deficiënte en controle muizen na *K. pneumoniae* injectie (im). Er werden 2 verschillende doses gebruikt. 1×10^5 CFU (■, SAP^{-/-} (n = 8); ▲, SAP^{+/+} (n = 11)) en 1×10^4 CFU (▼, SAP^{-/-} (n = 7); ◆, SAP^{+/+} (n = 11)); (B) Overleving van Hp-deficiënte en controle muizen na *K. pneumoniae* injectie (im). Er werd een dosis van 1×10^4 CFU (■, Hp^{-/-} (n = 8); ▲, Hp^{+/+} (n = 9)) en een dosis van 1×10^3 CFU (▼, Hp^{-/-} (n = 8); ◆, Hp^{+/+} (n = 9)) geïnjecteerd.

Hieruit blijkt dat noch SAP, noch Hp een significante bijdrage leveren tot de protectie (of gevoeligheid) tegenover een infectie met *K. pneumoniae*.

II.4. BESPREKING

Sepsis wordt veroorzaakt door de massale aanwezigheid van bacteriën in de circulatie en wordt gekenmerkt door het gelijktijdig optreden van een hevige inflammatie, activatie van de coagulatie en fibrinolyse. Verschillende auto-amplificatieprocessen zorgen voor een steeds erger wordende inflammatie, waardoor uiteindelijk het endotheel ernstige schade oploopt, leidend tot een verminderde wefselperfusie, en uiteindelijk tot hypoxia en orgaanfalen. Sepsis is een enorm probleem wereldwijd, vooral in ziekenhuizen. In de Verenigde Staten alleen al sterven jaarlijks meer dan 100.000 mensen als gevolg van sepsis. *K. pneumoniae* is, na *E. coli*, een van de meest voorkomende stammen, die geïsoleerd wordt uit sepsis-patiënten. Nochtans zijn deze bacteriën ongevaarlijk in normale omstandigheden. Pas wanneer het immuunsysteem niet meer naar behoren functioneert, of andere prioriteiten heeft (bijvoorbeeld tijdens zware ziekte, bij zware verwondingen, AIDS,...) kunnen deze opportunistische pathogenen voor ernstige problemen zorgen.

Eén van de eerste zaken die men doet als men vermoedt dat een patiënt sepsis heeft, is antibiotica toedienen. Veel bacteriële stammen zijn echter resistent geworden voor de meeste antibiotica. Bovendien hebben klinische trials, waarbij gepoogd wordt om de pro-inflammatoire cytokines, die een centrale rol spelen tijdens septische shock, te neutraliseren, niet veel succes opgeleverd. Alternatieven dringen zich dus op.

Niet specifieke resistentie tegen infectie maakt deel uit van ons aangeboren immuunsysteem en kan gestimuleerd worden door toediening van bepaalde, al dan niet synthetisch aangemaakte agentia, die gelijkenissen vertonen met structuren van de celwand van Gram-negatieve bacteriën. Wegens hun toxiciteit mogen deze echter niet therapeutisch toegediend worden bij de mens. Inzicht in het mechanisme van NSRI zou eventueel wel kunnen leiden tot alternatieve behandelingen.

Van der Meer (1988) heeft aangetoond dat IL-1 bescherming kon bieden tegen een letale infectie met *K. pneumoniae*. De aspecificiteit van deze bescherming werd geïllustreerd door het feit dat de muizen ook beschermd waren tegen een *P. aeruginosa*-infectie. Bovendien hebben Van 't Wout *et al.* (1988) ook bescherming opgewekt met IL-1 tegen de schimmel *C. albicans*. TNF en IL-6 konden eveneens bescherming bieden, hoewel in mindere mate dan IL-1 (Van der Meer, 1988; Van der Meer *et al.*, 1989). De bescherming was optimaal wanneer het IL-1 24h voor de bacteriële infectie toegediend werd (bij de schimmelinfectie kon IL-1 echter ook nog beschermen wanneer het 6h na de infectie toegediend werd). Dit was waarschijnlijk te wijten aan het feit dat er een bepaalde tijd nodig is om 'beschermende eiwitten' aan te maken die de infectie helpen te bestrijden. Daarbij werd in de eerste plaats gedacht aan de door hepatocyten geproduceerde acute fase eiwitten, vooral omdat IL-1 een sterke induceerder is van een subset van deze eiwitten. Het vermoeden dat AFP's, die hoofdzakelijk door hepatocyten gesynthetiseerd worden, een rol spelen bij de IL-1-

geïnduceerde bescherming werd versterkt door het feit dat Vogels *et al.* (1993) aantoonde dat galactosamine, dat specifiek transcriptie en translatie in hepatocyten inhibeert, de door IL-1-geïnduceerde bescherming grotendeels kon inhiberen (Vogels *et al.*, 1993).

Om de rol van acute fase eiwitten, maar vooral AGP, in NSRI te onderzoeken hebben wij vooreerst de door IL-1-geïnduceerde bescherming tegen *K. pneumoniae* proberen te reproduceren. 1 μ g IL-1 bleek optimaal te beschermen wanneer het 12h voor de bacteriële infectie toegediend werd. Wanneer de muizen 24h of 48h voor de infectie met IL-1 behandeld werden bleek er ook bescherming op te treden.

Onderhuidse terpentijn injectie leidt tot de vorming van een steriel absces, waarbij weefselschade optreedt. Daardoor wordt een acute fase respons geïnduceerd. Wij hebben aangetoond dat terpentijn injectie bescherming biedt wanneer de muizen er 48h, maar niet meer wanneer ze er 24h voor de bacteriële infectie mee behandeld worden. Aangezien inductie van IL-1 optimaal is 24-48h na terpentijn injectie (Gershenwald *et al.*, 1990) kan de bescherming na terpentijn injectie voor een deel te wijten zijn aan de inductie van IL-1.

Om na te gaan of de door IL-1 geïnduceerde bescherming gemedieerd werd door inductie van AGP werd eerst nagegaan of AGP inderdaad bescherming kon bieden tegen *K. pneumoniae*-infectie. Dit bleek inderdaad het geval. Een dosis van 10 mg AGP bood bescherming wanneer dit juist voor (-2h) de bacteriële infectie toegediend werd of wanneer telkens 5 mg toegediend werd 2h voor en 24h na de bacteriële infectie. Er kon echter geen bescherming meer opgewekt worden wanneer de muizen enkel 24h na de bacteriële infectie met AGP behandeld werden. De muizen konden ook niet beschermd worden na voorbehandeling met eenzelfde dosis BSA, wat erop duidt dat de bescherming door AGP geen specifiek effect is.

De mogelijke betrokkenheid van AGP bij terpentijn en IL-1 geïnduceerde bescherming werd nagegaan door de inductie van AGP te meten na terpentijn of IL-1 injectie respectievelijk. Hieruit bleek dat er een significante inductie van AGP was in het serum van de muizen 12-48h na IL-1 en 48-72h na terpentijn injectie. Deze piek inductie van AGP bleek overeen te stemmen met de tijd die nodig is na injectie van IL-1 of terpentijn respectievelijk om een optimale bescherming te bekomen tegen de bacteriële infectie. De serumconcentratie van het AGP tijdens de piek inductie na IL-1 of terpentijn injectie (2-3 mg/ml) stemde overeen met de geïnjecteerde dosis AGP. Er werd namelijk nagegaan hoe snel humaan AGP uit de circulatie verwijderd werd na ip injectie ervan. 2h na injectie was de concentratie in het serum nog ongeveer 2.3 mg/ml. Wanneer terpentijn 24h voor de bacteriële infectie toegediend werd, trad er geen bescherming op. Dit is in overeenstemming met het feit dat er 24h na terpentijn injectie nauwelijks al AGP-inductie is. De bescherming die optreedt 12h na IL-1 injectie is beter dan wanneer het IL-1 24h voor de bacteriële infectie toegediend wordt; nochtans is er 24h na IL-1 injectie meer AGP aanwezig in het serum. Dit kan op een logische manier verklaard worden: Wanneer het IL-1 12h voor de infectie toegediend wordt, dan

treedt de piekinductie van AGP op tijdens de infectie. Wanneer het IL-1 24h voor de infectie toegediend wordt, is er tijdens de infectie een daling van de AGP serumconcentratie. Logischerwijs is de bescherming 48h na IL-1 injectie nog minder uitgesproken, aangezien al een groot gedeelte van het AGP al uit de circulatie verdwenen is op het moment dat de muizen geïnfecteerd worden.

Het beschermend effect van AGP werd bevestigd door gebruik te maken van transgene muizen, die continu hoge hoeveelheden rat AGP in het serum produceren. Deze transgene muizen bleken significant beschermd tegen een letale infectie met *K. pneumoniae*, in tegenstelling tot hun wild type nestgenoten. Hieruit blijkt ook nog eens de aspecificiteit van de bescherming, aangezien zowel exogeen toegediend runder of humaan AGP, als endogeen geproduceerd rat AGP (in de transgene muizen) of muis AGP (in het geval van terpentijn- en IL-1 geïnduceerde bescherming) allemaal bescherming boden, ondanks het feit dat AGP een van de meest divergente eiwitten is tussen verschillende diersoorten.

Om iets meer te weten te komen over het mechanisme van de bescherming werd de verspreiding/opruiming van de bacteriën nagegaan door bloedstalen en gehomogeniseerde weefselstalen uit te platen en het aantal aanwezige bacteriën te tellen. Dit bleek gereduceerd bij muizen die voorbehandeld waren met een beschermende dosis terpentijn, IL-1 of AGP en in de transgene muizen, in vergelijking met controle muizen. Het aantal bacteriën na terpentijn injectie bleek ook beduidend lager in vergelijking met IL-1 of AGP voorbehandeling. Dit wijst waarschijnlijk op het feit dat terpentijn ook nog andere beschermingsmechanismen (al dan niet acute fase eiwitten) induceert. Het gereduceerde aantal bacteriën na terpentijn, IL-1 of AGP voorbehandeling, kan op meerdere manieren verklaard worden: (i) AGP is cytotoxisch voor de bacteriën. We hebben echter aangetoond dat AGP niet rechtstreeks cytotoxisch is voor *K. pneumoniae*. (ii) AGP oefent een stimulerend effect uit op de opruiming van de bacteriën in het bloed en de verschillende organen. Dit zou kunnen via interactie van AGP met de bacteriën. Moore *et al.* (1997) hebben inderdaad aangetoond dat AGP kan binden op LPS. Aangezien *K. pneumoniae* een kapsel bezit, zijn de bacteriën resistenter aan fagocytose. Binding van AGP op de bacteriën kan eventueel fagocytose van de bacteriën bevorderen, aangezien macrofagen een lectine-achtige receptor bezitten die AGP bindt (Pimpaneau *et al.*, 1989). (iii) AGP verhindert dat de bacteriën zich via het bloed naar de organen kunnen verspreiden. Het verhinderen van de verspreiding van de bacteriën zou een gevolg kunnen zijn van het effect dat AGP heeft op het endotheel, waar het instaat voor het behoud van de capillaire permeabiliteit. Haraldson en Rippe (1987) hebben aangetoond dat AGP bijdraagt tot de normale permselectiviteit van het endotheel, waarschijnlijk deels via het verhogen van de negatieve lading ervan en deels via sterische effecten. Muchitsch *et al.* (1996) hebben inderdaad kunnen aantonen dat AGP in staat was om de capillaire lek, geïnduceerd door verscheidene agonisten van de vasculaire permeabiliteit, tegen te gaan. Dit effect van AGP zou op twee manieren kunnen

bijdragen tot de bescherming tegen een bacteriële infectie. Vooreerst zou AGP - via sterische hindering of ladingsinteracties met het polysaccharide deel in het LPS van de bacteriële celwand - ervoor kunnen zorgen dat de bacteriën moeilijker de bloedbaan kunnen binnendringen. Vervolgens, eenmaal de bacteriën in de bloedbaan zijn, kan AGP ervoor zorgen dat de doorbloeding van de organen langere tijd gevrijwaard blijft, terwijl de bacteriële infectie bestreden wordt. Dergelijk passief beschermingsmechanisme lijkt ook meer logisch omdat AGP in verscheidene uiteenlopende inflammatoire modellen bescherming kan bieden (zie I.3.8. α_1 -Acid Glycoprotein: inflammatory and immunomodulating properties)

Sialyl Lewis^x (sLe^x) structuren die op AGP kunnen voorkomen, kunnen betrokken zijn in de interactie van AGP met het endotheel. sLe^x-structuren zijn namelijk het ligand van selectines op de endotheel celwand en spelen een rol in de adhesie van neutrofielen aan het endotheel. Aangezien de muis echter geen sLe^x structuren kan aanmaken wegens een defect in het α_3 -fucosyltransferase (een essentieel enzyme in de synthese van sLe^x structuren (Havenaar et al., 1998), is het niet waarschijnlijk dat deze structuren een rol spelen in de waargenomen bescherming.

Aangezien de mogelijkheid reëel is dat niet enkel AGP, maar ook nog andere acute fase eiwitten kunnen betrokken zijn in NSRI, werd, gebruik makend van muizen die deficiënt voor serum amyloïd P (SAP), haptoglobine (Hp) en α_2 -macroglobuline (α_2 M, zie hoofdstuk IV) respectievelijk, nagegaan of deze eventueel een verhoogde gevoeligheid vertonen tegen een bacteriële infectie. Dit bleek echter niet het geval. Dit sluit echter de eventuele betrokkenheid van nog andere acute fase eiwitten niet uit.

HOOFDSTUK III – TRANSGENE OVEREXPRESSIE VAN α ₁-ZUUR GLYCOPROTEINE LEIDT TOT SENSITIZERING VOOR DE ONTWIKKELING VAN ACUTE COLITIS

III.1. INLEIDING

Ulceratieve colitis valt, samen met de ziekte van Crohn, onder de noemer inflammatoir darmlijden (IBD). Ulceratieve colitis is een chronische aandoening van het colon en wordt gekenmerkt door afwisselende periodes van remissie (afwezigheid van de ziekte) en plotse opstoten van inflammatie (relaps). De eerste ziekteverschijnselen doen zich voor tussen de leeftijd van 15 en 30 jaar. De symptomen zijn ondermeer bloederige diarree en dehydratie, buikkrampen, koorts en gewichtsverlies. De oorzaak van de ziekte is nog niet gekend, maar zowel genetische als omgevingsfactoren spelen een belangrijke rol. De ziekte wordt vooral behandeld met corticosteroïden, die anti-inflammatoir werken. Volledige genezing enkel en alleen met medicatie komt niet vaak voor. In ernstige gevallen kan een chirurgische ingreep vereist zijn. In dit geval wordt meestal het volledige colon verwijderd en wordt een ileostomie uitgevoerd. Om beter te kunnen voorspellen wanneer er een relaps zou optreden, en aldus preventief te kunnen ingrijpen met de nodige medicatie, werd een verband gezocht tussen de kans op relaps en een meetbare parameter in het bloed van de patiënten. Eén van de parameters die geregeld uit dergelijke studie naar voren kwam, is de serum concentratie AGP. Een hoge serum concentratie AGP staat rechtstreeks in verband met een verhoogde kans op relaps (Kjeldsen *et al.*, 1997; Lubega en Davies, 1990; Wright *et al.*, 1987).

Om na te gaan of hoge AGP concentraties eventueel een actieve rol spelen bij het ontwikkelen van colitis, hebben we gebruik gemaakt van een muis model van acute colitis. Om acute colitis te induceren werd dextraan natriumsulfaat (DSS) gedurende enkele dagen aan het drinkwater van AGP transgene muizen en hun wild type nestgenoten toegevoegd. De muizen werden vervolgens in detail bestudeerd.

III.2. RESULTATEN: 'OVEREXPRESSION OF α 1-ACID GLYCOPROTEIN IN TRANSGENIC MICE LEADS TO SENSITIZATION TO ACUTE COLITIS'

Tino Hochepeid¹, Andy Wullaert¹, Franklin G. Berger², Heinz Baumann³, Peter Brouckaert¹, Lothar Steidler¹, and Claude Libert¹

Submitted for publication to the Journal of Immunology

¹Department of Molecular Biology, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology and University Ghent, Ghent, Belgium; ²Department of Biological Sciences, University of South Carolina, Columbia, South Carolina 29208, and the ³Department of Molecular and Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York 14263

α 1-Acid glycoprotein (α 1-AGP) is an acute phase protein in most mammalian species. Its concentration rises 2–5 fold during an acute phase reaction. Its serum concentration has often been used as a marker of disease. High α 1-AGP levels were found to have a prognostic value for increased risk of relapse in inflammatory bowel disease (IBD). We found that transgenic mice, overexpressing the rat α 1-AGP gene, are more susceptible to DSS-induced acute colitis, which is used to mimic the conditions of a relapse. When adding 2% DSS in the drinking water, homozygous α 1-AGP transgenic mice start losing weight and show rectal bleeding significantly earlier than heterozygous transgenic or wt mice. The survival time of the homozygous transgenic mice is significantly shorter compared to heterozygous and wt mice. The higher susceptibility of the homozygous α 1-AGP transgenic mice to DSS-induced acute colitis was also reflected in higher local MPO-levels, higher inflammation scores of the colon and higher systemic IL-6 and SAP-levels. Local inflammatory parameters, such as inflammation scores were also significantly different in heterozygous transgenic mice compared to wt mice, indicating a local dosage effect. In homozygous transgenic mice, significant higher amounts of bacteria were found in organs, while IgA levels were only slightly lower than in control mice. We suggest that high serum levels of α 1-AGP can have a synergistic effect on the development of DSS-induced acute colitis, possibly by contributing to the local activation of inflammatory cells, contributing to tissue damage, leading to increased permeability of the mucosa.

Introduction

α 1-Acid glycoprotein (α 1-AGP) is a highly glycosylated protein of 43 kDa. Due to the presence of sialic acids it is very negatively charged with a pI of only 2.7 (1). It is an acute phase protein in all mammals investigated so far (2). α 1-AGP is produced mainly in the liver (3), although also some extrahepatic synthesis has been reported (4-6). In mouse serum, α 1-AGP is normally

found at a concentration of 0.2 - 0.4 mg/ml (7). During an acute phase condition, the concentration rises 2-5 times, making it one of the predominant proteins in the serum. Like most acute phase proteins, α 1-AGP is induced both by cytokines and corticosteroids (8). Although α 1-AGP is an abundant protein, its real physiological significance is not fully understood. Inhibition of platelet aggregation (9) and of neutrophil function (10-12) have been

reported. Moore et al. (1997) showed that α ₁-AGP was able to bind LPS (13). Also, α ₁-AGP was found to inhibit selectively the transport of molecules through the endothelial layer (14-15). *In vivo* protective effects of α ₁-AGP have been described (16-21). Besides anti-inflammatory properties, α ₁-AGP has also been shown to potentiate the secretion by macrophages of pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 (22-23).

Like other acute phase proteins, α ₁-AGP is often used as a disease marker for e.g. diabetes mellitus (24), breast cancer (25), Eales' disease (26) and IBD (27-30). Moreover, α ₁-AGP concentrations can have a prognostic value for increased risk of vascular disease mortality (31). Interestingly, it was also found that high serum concentrations of α ₁-AGP are positively correlated with the risk of relapse in IBD (32-34).

The human inflammatory bowel diseases, ulcerative colitis and Crohn's disease, are chronic inflammatory disorders of the intestinal tract. The etiology of both diseases is unknown. There is evidence that the pathogenesis involves complex interactions among genetic, immunological, and environmental factors (35). IBD is thought to be the result of a dysregulated response that has its origin in genetic factors which are activated by a variety of environmental factors, including those that affect the nature of the bacterial flora itself (36). Clinical studies are necessarily limited to patients with established disease; therefore, early events of the disease are difficult to approach. Several experimental models of colitis have been introduced to study factors that can induce intestinal inflammation. DSS is an agent that, when administered in the drinking water, induces a reproducible colitis in mice. Depending on the way of administration, an acute as well as a chronic colitis can be induced. Since we were interested in studying the phenomenon of relaps, we used the acute DSS model. Although the exact mechanism of DSS-induced mucosal injury is not fully understood, it has been proposed that a direct toxic effect on mucosal epithelial cells is a key feature in this colitis model (37-38).

Ingastric treatment with *Lactococcus lactis*, secreting IL-10 also improved the pathology of the disease (39).

We here show that transgenic mice expressing constitutively high levels of α ₁-AGP in the circulation are extremely sensitive to acute colitis induced by administration of DSS in the drinking water.

Materials and methods

Mice: rat α ₁-AGP transgenic mice were generated as described previously (40). They were generated by injecting genomic DNA into (C57BL/6 × DBA/2)F1 zygotes, and the resulting transgenic mice were back-crossed eight generations into a C57BL/6 background. Heterozygous transgenic mice from the line 9.5-5 constitutively produce about 4.5 mg/ml α ₁-AGP. This is 10-fold more than wild-type (wt) animals. The colony was propagated by breeding heterozygous transgenic mice with C57BL/6 female mice. The offspring, containing heterozygous transgenics and wt littermates, was genotyped at weaning age by enzyme-linked immunosorbent assay. 100 μ l of blood was collected by retro-orbital bleeding, after which serum was prepared. α ₁-AGP was purified by phenol extraction (41) and coated on the bottom of an enzyme-linked immunosorbent assay plate. After washing, rat α ₁-AGP was detected using an anti-rat α ₁-AGP polyclonal antibody (generated by H. Baumann in rabbits) (1/1,000) and an anti-rabbit antibody, conjugated to alkaline phosphatase (Sigma, St. Louis, MO; 1/5,000). The anti-rat α ₁-AGP antibody did not cross-react with mouse α ₁-AGP. About 50% of the offspring were heterozygous transgenic. Only female mice of 8-12 weeks were used in the experiments. Both transgenic and control (nontransgenic littermate) mice had comparable body weights. Mice were kept in a conventional, air-conditioned mouse room in 12-h light-dark cycles and received food and water ad libitum. Mice were bled by retro-ocular bleeding or heart puncture under ether or tribromoethanol (160 mg/kg) anesthesia, respectively, and serum was prepared by clotting 30 min at 37 °C,

removal of the clot, and centrifugation (15 min at 15,000 × g).

Disease model: Acute colitis was induced by adding 2% Dextran Sodium Sulfate (DSS) in the drinking water (tap water) of the mice. All mice were weighed daily and checked for gross bleeding. Four days after the start of DSS administration, mice were euthanized using tribromoethanol (160 mg/kg) and blood was taken by heart puncture. For determination of histological score and local TNF and MPO-levels, the colon was removed and washed extensively with PBS. The colon was cut longitudinally. The distal third of the colon was cut and fixed in 10% formalin in PBS. 2 pieces of colon tissue were cut from the distal part of the colon, weighed and stored in sterile PBS or buffer A (0,5% hexadecyl trimethylammonium bromide in 50 mM potassium phosphate buffer pH 6,0) at -20°C to determine local TNF and MPO-levels respectively. Sections of the paraffin embedded material were made longitudinally. Three 5 μ m sections were cut at a distance of 20 μ m. The sections were stained with haematoxylin-eosin. Histological analysis was performed as described by Kojouharoff et al. (42), in a double blind fashion. Mice were scored individually and each score represented the mean of 3 sections. Histology was scored as follows: epithelium: 0 = normal morphology; 1 = loss of goblet cells; 2 = loss of goblet cells in large areas; 3 = loss of crypts; 4 = loss of crypts in large areas; infiltration: 0 = no infiltrate; 1 = infiltrate around crypt bases; 2 = infiltrate reaching to the *Lamina muscularis mucosa*; 3 = extensive infiltration reaching to the *L. muscularis mucosa*, thickening of the *mucosa* with abundant oedema; 4 = infiltration of the *L. submucosa*. The colitis score of individual mice represents the sum of the different histological subscores and reaches a maximum value of 8. The mice that were not killed 4 days after the start of DSS administration were scored for survival, weighed daily and checked for gross bleeding. 6 days after DSS administration, blood was taken under light ether anesthesia, by retro-ocular bleeding.

Reagents: bovine serum albumin (BSA), alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG, p-nitrophenyl phosphate, hexadecyl trimethylammoniumbromide and o-dianisidine dihydrochloride were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). DSS (MW 40,000) was obtained from ICN Pharmaceuticals, Inc. (Costa Mesa, CA). Sheep anti-mouse SAP, rabbit anti-mouse SAP, mouse SAP standard and pure human MPO were obtained from Calbiochem-Novabiochem International, (San Diego, CA). Goat anti-mouse Ig (H+L), alkaline phosphatase-conjugated goat anti mouse IgA, and mouse IgA standard was obtained from Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, AL).

MPO determination: MPO activity was measured according to Bradley *et al.*, 1982 (43). Briefly, tissue samples were weighed and homogenized via sonication in buffer A (0,5% hexadecyl trimethylammonium bromide in 50 mM potassium phosphate buffer pH 6,0). Homogenates then underwent 3 freeze (liquid N₂) thaw (37°C waterbath) cycles of each 5 minutes. After centrifugation for 20 minutes, 20 μ l of the supernatant of each sample was mixed with 280 μ l buffer B (0,167 mg/ml o-dianisidine dihydrochloride + 0,0005% H₂O₂ in 50 mM potassium phosphate buffer pH 6). 20 minutes thereafter, optical density was measured spectrophotometrically at 490 nm. Pure human MPO was used as a standard.

IgA determination: For the isolation of faeces IgA, 3 fresh fecal pellets were weighed and dissolved overnight at 4°C in 1 ml of faeces dissolving solution (0,05% NaN₃ and 10% FCS in PBS). Faeces was mixed by shaking and after high speed centrifugation supernatant was collected and stored at -20°C until use. IgA ELISA: microtiter plates were coated overnight with a 1/1000 dilution of a goat anti-mouse Ig (H+L). After washing, free places were blocked using 1% BSA solution in PBS (1 h at 37°C). Samples and a standard were titrated in 1/3 steps in the assay and incubated at 37°C for 1 h. After washing, the second Ab (an, alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgA) was added in 1/1000 dilution and the plates were incubated 1 h at 37°C. The

assay was developed using p-nitrophenylphosphate at 405 nm.

Measurement of serum parameters: TNF was measured by the cytotoxic assay on WEHI 164 clone 13 cells, as described (44). Briefly, serial dilutions of samples and TNF standards were incubated with the cells in 96-well microtiter plates (30.000 cells/well) in the presence of 1 μ g/ml of actinomycin D. After 18 h of incubation, the number of surviving cells was determined by the MTT colorimetric assay. Detection limit was 0,1 pg/ml.

IL-6 was determined as described previously (45). IL-6-dependent 7TD1 cells were cultured in 96-well microtiter plates (7000 cells/well) in the presence of medium, serial dilutions of serum, or a murine IL-6 standard. After 3 days of culture, the number of living cells was determined in a hexosaminidase colorimetric assay; titers were assigned by comparing the dilutions of samples and standard needed to obtain half-maximal growth of 7TD1 cells.

SAP was measured by a sandwich ELISA as previously described (46). Briefly, 96-well microtiter plates were coated overnight with a 1/1000 dilution of a sheep anti-mouse SAP. After washing, free places were blocked using 1% BSA solution in PBS (1 h at 37°C). Serum and a standard were diluted 25-fold and titrated in 1/5 steps in the assay in triplicates, and incubated at 37°C for 1 h. After washing, the second Ab (a rabbit anti-mouse SAP) was added in 1/5000 dilution and the plates were incubated 1 h at 37°C, after which an anti-rabbit Ab, alkaline phosphatase-conjugated, was added and incubated for another hour at 37°C. The assay was developed using p-nitrophenylphosphate at 405 nm.

Bacterial counts: Mice were sacrificed by cervical dislocation. Before removing the organs, mice were perfused with 10 ml of sterile PBS. For homogenization, the liver was diluted (w/v) 2-fold; spleen, kidney, colon and lung were diluted (w/v) 10-fold. The suspensions were diluted and plated out on sterile Lurient Broth. After overnight incubation at 37°C, CFU numbers were counted.

Statistics: Mean values and SD were compared using an unpaired student's t-test, with Welch's correction in the case of

nonhomogeneous variances. Survival curves (Kaplan-Meier plots) were compared using a Log Rank test, and final outcomes using Fisher's exact test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. *, ** and *** represent $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. NS = not significant.

Results

Clinical symptoms during DSS induced colitis. Different concentrations of DSS were tested first to find the optimal dose for induction of an acute colitis. Adding 2% DSS in the drinking water of the mice was proven to be sufficient in our hands (results not shown). After administration of 2 % DSS in the drinking water of homozygous and heterozygous α ₁-AGP transgenic mice and of wild type littermates, mice were weighed daily and the stool was checked for the presence of blood. This was done until most homozygous transgenic mice started to die (day 7). At day 4, half of the mice from each group ($n = 18$; $n = 19$ and $n = 15$ for the homozygous and heterozygous transgenic and the wt mice respectively) were killed to determine inflammatory parameters. In the rest of the mice ($n = 18$; $n = 19$ and $n = 15$ for the homozygous and heterozygous transgenic and the wt mice respectively) weight loss and survival were recorded. Starting from day 2 of DSS administration, a significant difference in the % weight loss of the mice was found (fig. 1A). The weight of homozygous α ₁-AGP transgenic mice was significantly lower than that of the heterozygous transgenic ($p = 0.0241$) and the wt ($p = 0.0035$) mice. The difference in weight loss was most pronounced starting from day 3 ($p < 0.0001$ for the difference in weight between homozygous and heterozygous transgenic mice on the one hand and homozygous and wt mice on the other hand at day 3, 4, 5 and 6). Homozygous transgenic mice started to show gross bleeding at day 2. At day 3, the number of homozygous transgenic mice that showed gross bleeding was significantly higher than in wt mice ($p = 0.0032$) and at day 5, all homozygous transgenics showed gross bleeding ($p = 0,0003$ compared to wt mice). In the heterozygous and wt mice, gross bleeding was observed at day 3 and 4

respectively and all mice showed gross bleeding at day 7 and 8 respectively. The number of heterozygous transgenic mice that showed gross bleeding was significantly different compared to that of wt mice at day 6 and 7

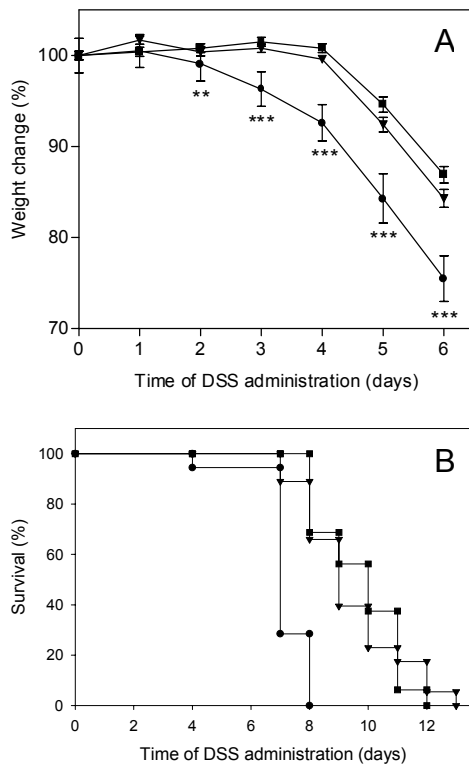


Figure 1: (A) Percentage of weight loss during DSS-induced acute colitis. 2 % of DSS was given in the drinking water of homozygous α_1 -AGP transgenic (●; n = 36 and n = 17 from day 5), heterozygous α_1 -AGP transgenic (▼; n = 38 and n = 19 from day 5) and wild type mice (■; n = 30 and n = 15 from day 5). Weight was recorded daily. Statistical significance is compared to wt mice. (B) Survival during DSS-induced acute colitis. 2 % of DSS was given in the drinking water of homozygous α_1 -AGP transgenic (●; n = 18), heterozygous α_1 -AGP transgenic (▼; n = 19) and wild type mice (■; n = 15). Survival was recorded daily. Statistical significance is compared to wt mice.

(p = 0,0202 and p = 0,0228 respectively) (table 1). Survival of the homozygous transgenic mice was significantly reduced compared to the heterozygous and wt mice (p < 0.0001). Homozygous transgenic mice all died between day 4 and day 8, while heterozygous and wt mice died between day 7 and 13 and between day 8 and 12 respectively (fig. 1B).

Local inflammatory parameters. MPO concentration was determined as a measure

of neutrophil influx, on a distal piece of the colon of control mice from each group before DSS administration and on day 4 of DSS. 4 days after DSS administration, there was a significant increase in MPO levels in

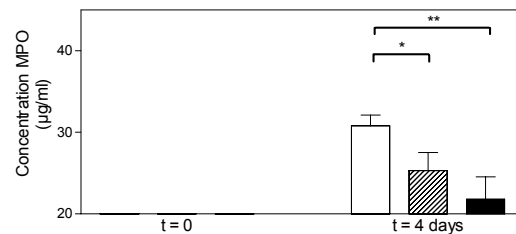


Figure 2: Local MPO levels after DSS treatment. MPO levels were determined in colon samples of homozygous α_1 -AGP transgenic (n = 18; open bars), heterozygous α_1 -AGP transgenic (n = 19; hatched bars) and wild type mice (n = 15; black bars), 4 days after administration of 2 % DSS and were compared to negative controls of the corresponding genotype (n = 5 for each group). Statistical significance is compared to homozygous transgenic mice.

all three groups of mice, compared to control levels (p < 0.0001 and p = 0.0013 for the homo- and heterozygous mice and for the wt mice respectively). Moreover, there was also a significant difference after DSS administration between homozygous and heterozygous transgenic mice on the one hand and between homozygous transgenic and wt mice on the other hand (p = 0.0417 and p = 0.0045 respectively) (fig. 2). TNF-levels were determined on colon samples of control mice of each group before and after 4 days of DSS administration. There was no local TNF detectable (results not shown). Finally the inflammation of the distal part of the colon was scored histologically in a double blind fashion, 4 days after DSS administration. A significant increase in the inflammation score for all three groups of mice was found when compared to control mice before DSS administration (p < 0.0001, p = 0.0003 and p = 0.044 for homozygous transgenic, heterozygous transgenic and wt mice respectively). There is also a significant difference between the different groups, 4 days after DSS administration. Homozygous transgenic mice have a significant higher inflammatory score than heterozygous transgenic (p < 0.0001) and than wt mice (p < 0.0001). Moreover, heterozygous transgenic mice also have a significant higher inflammation score,

compared to wt mice ($p = 0.0056$) (fig. 3A). A representative example of colon sections of negative controls, and wt, homo- and heterozygous transgenic mice 4 days after

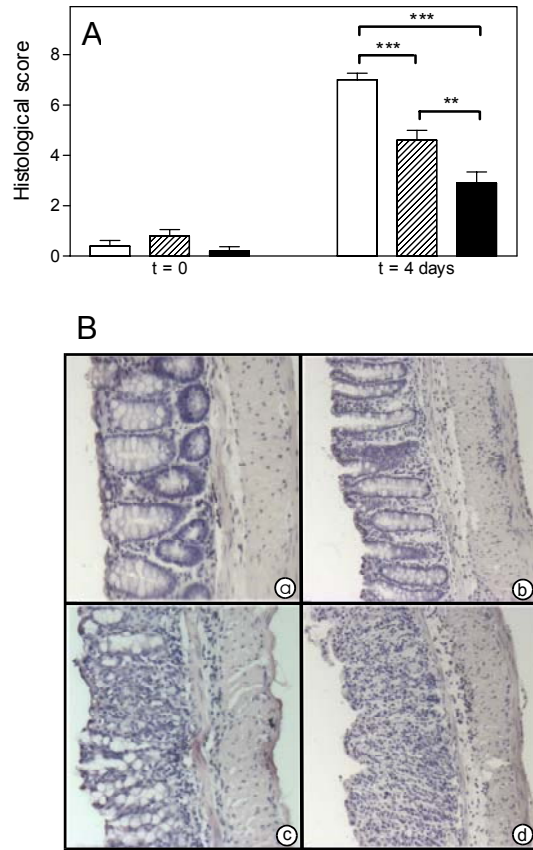


Figure 3: (A) Histological score after DSS treatment. 4 days after 2% DSS-treatment, the histological score was determined of the distal part of the colon from homozygous α_1 -AGP transgenic ($n = 18$; open bars), heterozygous α_1 -AGP transgenic ($n = 19$; hatched bars) and wild type mice ($n = 15$; black bars) and compared to negative controls of the corresponding genotype ($n = 5$ for each group). Statistical significances are based on homozygous and heterozygous transgenic vs. wt mice, and homozygous vs. heterozygous transgenic mice. (B) Representative distal colon sections (100x) stained with hematoxylin eosin. (a) Section of a negative control (no DSS-treatment), showing a normal crypt morphology, with crypt bases resting on the *L. muscularis mucosa*, and no inflammatory infiltrate. (b) Section of a wt mouse 4 days after DSS-treatment. Observed are local loss of goblet cells and some inflammatory infiltrate at the crypt base, which is no longer resting on the *L. muscularis mucosa*. (c) Section of a heterozygous transgenic mouse, showing local crypt destruction and inflammatory infiltrate reaching to the *L. muscularis mucosa*. (d) Section of a homozygous transgenic mouse, with total destruction of crypt structure and inflammatory infiltrate reaching into the *submucosa*.

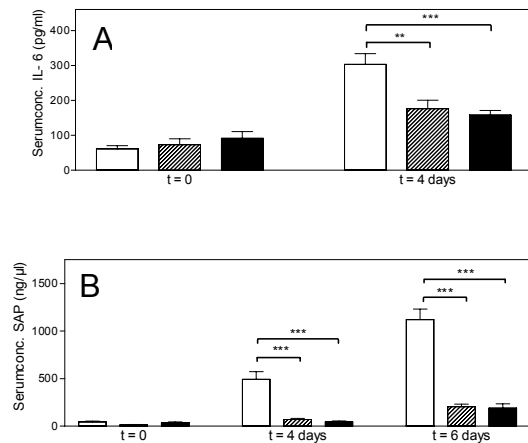


Figure 4: (A) IL-6 serum concentration during DSS-treatment. 4 days after DSS treatment, IL-6 levels were determined in the serum of homozygous α_1 -AGP transgenic ($n = 36$; open bars), heterozygous α_1 -AGP transgenic ($n = 38$; hatched bars) and wild type mice ($n = 30$; black bars). IL-6 levels were compared to negative controls of the corresponding genotype ($n = 5$ for each group). Statistical significance is compared to homozygous transgenic mice. (B) SAP serum concentration during DSS-treatment. 4 and 6 days after DSS-treatment, SAP-levels were determined in the serum of homozygous α_1 -AGP transgenic ($n = 36$ on day 4 and $n = 17$ on day 6; open bars), heterozygous α_1 -AGP transgenic ($n = 38$ on day 4 and $n = 19$ on day 6; hatched bars) and wild type mice ($n = 30$ on day 4 and $n = 15$ on day 6; black bars). SAP-levels were compared to negative controls of the corresponding genotype ($n = 5$ for each group). Statistical significance is compared to homozygous transgenic mice.

2% DSS administration is shown in fig 3B. Negative controls show no signs of crypt damage or inflammatory infiltrate. Wt mice show only mild inflammation, consisting of local, and in some cases a more general loss of goblet cells and inflammatory infiltrate localized to the crypt base. In heterozygous transgenic mice, crypt damage was in most cases confined to general loss of goblet cells or local crypt loss, while inflammatory infiltrate extended from the crypt base to the *Lamina muscularis mucosa*, with or without signs of oedema. In homozygous transgenic mice, crypt damage ranged from local to general crypt destruction and inflammatory infiltrate was reaching the *L. muscularis mucosa*, with abundant oedema, or even reached the *submucosa*. In all cases, inflammatory

genotype	% of the mice with gross bleeding (number of mice scored)								
	day 0	day 1	day 2	day 3	day 4	day 5	day 6	day 7	day 8
homoz. transgenic.	0 (36); NS	0 (36); NS	6 (36); NS	25 (36); **	80 (35); ***	100 (17); ***	100 (17); ***	100 (5); NS	N. D. (0)
heteroz. transgenic.	0 (38); NS	0 (38); NS	0 (38); NS	3 (38); NS	19 (38); NS	61 (19); NS	78 (19); * (19); *	100 (13); NS	100
wild type	0 (30)	0 (30)	0 (30)	0 (30)	6 (30)	38 (15)	50 (15)	75 (15)	100(10)

Table 1: Appearance of gross bleeding in mice (%) during DSS treatment. Starting at the time of DSS administration (day 0), the mice were checked for the appearance of gross bleeding each day, until day 8. The percentage of the mice is given, and between brackets the total number of mice that were checked. Significance was calculated using a χ^2 test, compared to the wt mice.

infiltrate consisted of a mixture of neutrophils and lymphocytes. Histologic observation clearly shows that α ₁-AGP transgenic mice show a much worse pathology than wt mice, with homozygous transgenic mice being even more affected than heterozygous transgenics.

Systemic inflammatory parameters. 4 days after DSS administration, half of the mice of each group was euthanized and blood was taken by heart puncture. The surviving mice were bled by retro-ocular bleeding 6 days after DSS administration. Cytokine and SAP levels were determined in the serum samples as a systemic measure of inflammation. IL-6 levels were increased in the three groups of mice, 4 days after DSS administration, compared to control mice ($p = 0.0004$ for the homozygous transgenic mice and $p = 0.0159$ for the wt mice). The increase in IL-6 concentration in the serum of heterozygous transgenic mice was not statistically significant. There was also a significant difference in IL-6 levels 4 days after DSS-administration, between the homozygous transgenic and the heterozygous transgenic mice on the one hand and between the homozygous transgenic and the wt mice on the other hand ($p = 0.0026$ and $p = 0.0002$ respectively) (fig.4A). TNF was not detected in the serum samples 4 days nor 6 days after DSS administration (results not shown). SAP levels in the serum 4 days after DSS administration were significantly increased in the homozygous transgenic mice ($p = 0.0059$), but not in heterozygous

transgenic and wt mice. 6 days after DSS administration, there was a significant increase in SAP levels in homozygous and heterozygous transgenic mice. The increase in SAP levels in wt mice was not statistically significant. We also found a significant difference in SAP levels 6 days after DSS administration compared to 4 days after DSS administration in the 3 groups of mice ($p < 0.0001$; $p = 0.0042$ and $p = 0.0037$ for the homozygous transgenic, the heterozygous transgenic and the wt mice respectively). Between the groups, there was a significant difference 4 days and 6 days after DSS administration between the homozygous and heterozygous transgenic mice on the one hand and between the homozygous and wt mice on the other hand ($p < 0.0001$ in all cases) (fig.4B)

Bacterial counts in organs. To test whether tolerization was destroyed 4 days after DSS administration, leading to spreading of bacteria in the tissues, homogenized tissues were plated out and the number of bacteria was counted. In lung, significantly more bacteria were observed in the homozygous transgenic mice, compared to the heterozygous transgenic and wt mice ($p = 0.0119$ and $p = 0.0007$ respectively). In liver and colon, we found significantly more bacteria in the homozygous mice, compared to the wt mice ($p = 0.0291$ and $p = 0.0331$ respectively). Although bacterial counts were also higher in the spleen of transgenic mice, the difference was not statistically significant, compared to wt mice (fig.5). IgA-levels in faeces were determined to see whether the

increase in bacterial load in homozygous transgenic mice was due to a decreased production of IgA in the colon. However no significant difference in the concentration of IgA in the three groups of mice was detected (fig. 6)

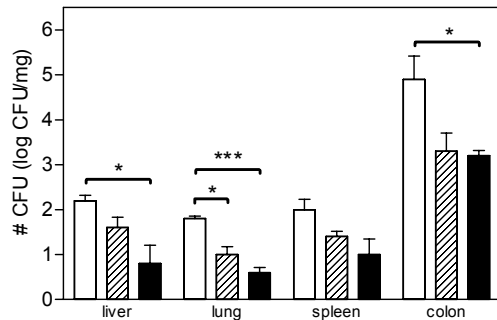


Figure 5: Bacterial load in different organs. 4 days after 2 % DSS treatment, tissues from homozygous α_1 -AGP transgenic (n = 4; open bars), heterozygous α_1 -AGP transgenic (n = 4; hatched bars) and wild type mice (n =4; black bars) were homogenized and plated on Luria Broth. Statistical significance is compared to homozygous transgenic mice.

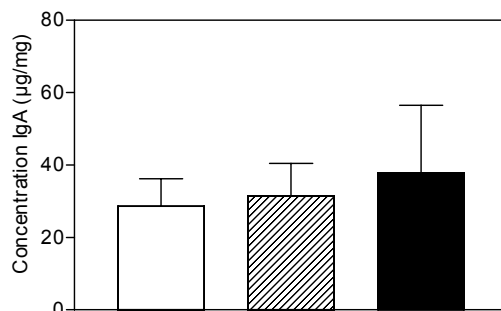


Figure 6: Determination of IgA levels during DSS treatment. 4 days after treatment with 2 % DSS, IgA levels from homozygous α_1 -AGP transgenic (n = 10; open bars), heterozygous α_1 -AGP transgenic (n = 10; hatched bars) and wild type mice (n=10; black bars) were determined.

Discussion

α_1 -AGP is one of the major acute phase proteins in all mammals investigated so far. During acute phase conditions, induced e.g. by infection, trauma or surgery, its serum concentration rises 2-5 times (2). Therefore, serum α_1 -AGP levels are sometimes used as a marker for diseases as e.g. diabetes mellitus (24), breast cancer (25), Eales' disease (26) and IBD (26-29). Moreover, α_1 -AGP concentrations can have a prognostic value for increased risk of vascular disease

mortality (31). More interestingly, high serum concentrations of α_1 -AGP were also found to be positively correlated with the risk of relapse in IBD (32-34). The exact physiological function of α_1 -AGP is not known yet; *in vitro* data show that α_1 -AGP has antiinflammatory (9) as well as proinflammatory (22-23) effects and immunomodulating properties (10-12). We also showed that α_1 -AGP is able to protect against TNF-induced lethality, and against a lethal Gram-negative infection with *K. pneumoniae* (16, 19, 21). Acute colitis, induced by administration of DSS in the drinking water of mice, is a useful model for studying the pathophysiological aspects of colonic inflammatory diseases as IBD and for evaluating new therapeutic targets and agents (47-48). Acute colitis can be used as a model to study relapse during IBD, since this is also an acute inflammatory condition (49). Clinical symptoms following DSS administration include hemocult positive and loose stools, followed by diarrhoea, gross bleeding, and weight loss. The earliest histological observation is loss of goblet cells, followed by crypt loss, which precedes an increase in mucosal permeability. Inflammation occurs secondary to crypt loss. The inflammatory infiltrate mainly consists of MPO-positive granulocytes (42, 50). The mechanism of DSS-induced colitis is not yet fully understood. DSS is thought to induce mucosal injury and inflammation initially through a direct toxic effect on epithelial cells with subsequent activation of macrophages resulting in cytokine mediated cytotoxicity (38, 51-54). Indeed, cytokines such as IL-1, TNF and IL-6 are increased in inflamed colonic mucosa (54-55), probably in part due to increased NF κ B activation (56). Anti cytokine therapy however has resulted in contradictory results. Whereas Arai *et al.* showed that neutralization of IL-1 activity reduced clinical symptoms (57), Kojouharoff *et al.* (42) have shown that neutralization of IL-1 or TNF activity aggravated acute colitis, while Olson *et al.* (58) observed no effect when using neutralizing antibodies to TNF. However, treatment of patients with Crohn's disease with an anti TNF antibody has already been proven to be succesful (59).

Also, treatment with dexamethasone aggravated DSS-induced acute colitis (42). In contrast, suppression of cytokine production by NF κ B inhibition improved clinical symptoms and decreased histological scores (55, 60).

The hypothesis that DSS would injure colonic epithelial cells and destroy intraepithelial tight junctions is strengthened by the observation that mice deficient in key mediators of protection and/or repair mechanisms in the colonic mucosa (like EGF-receptor and TGF α) and of factors preserving mucosal integrity of the colon (like Trefoil Factor), have considerably increased susceptibility to DSS (61-63).

It has been proposed that IBD in mice develops in response to a dysregulated immune response to bacterial components (64-66). After the induction of toxic injury by DSS on the colonic epithelial cells, some bacterial organisms may invade the mucosa (62) and escape into the circulation because of the increased permeability of the damaged mucosa. Indeed, IBD is considered an independent risk factor for bacterial endocarditis (66). In acute DSS-colitis, treatment with antibiotics led to an improvement of the histological parameters (67).

Using α_1 -AGP transgenic mice, continuously producing about 4,5 mg α_1 -AGP/ml (for the heterozygous mice (40); levels in homozygous mice are about twice as high (our unpublished results)), we found that, during DSS administration, homozygous α_1 -AGP transgenic mice started to show clinical signs of illness much earlier than the heterozygous transgenic or wt controls. Weight loss and gross bleeding started to appear faster in the transgenic mice compared to wt mice, and survival of the homozygous transgenic mice was significantly reduced compared to the heterozygous transgenic and wt mice. The clinical data clearly show a difference in response to DSS between the homozygous transgenics on the one hand and heterozygous transgenics and wt mice on the other hand. However, except for a minor but statistically significant difference in the appearance of gross bleeding, there was no significant difference in clinical parameters between heterozygous transgenics and wt

mice. The fact that the homozygous transgenic mice show clinical signs of illness relatively fast, indicates that the effect of α_1 -AGP is probably at one of the very early steps in the pathogenesis of the DSS-induced colitis.

Determination of local inflammatory parameters 4 days after DSS administration, did however reveal a dosage effect of the α_1 -AGP. The dosage effect of α_1 -AGP was most clearly seen when looking at the histological score of the colon samples. Homozygous transgenic mice have a significant higher score than heterozygous transgenic and than wt mice respectively, and heterozygous transgenic mice have a significant higher score compared to wt mice.

Increased MPO levels (and the increase of inflammation scores due to inflammatory infiltrate) are the result of increased influx of leukocytes into the inflamed tissue, which is mediated by binding of integrins, containing sialyl Lewis-X (Sle^x)-structures, on the surface of leukocytes to selectin ligands on the endothelium. Paradoxically, α_1 -AGP is believed to play an important role in the inhibition of extravasation due to the presence of competing Sle^x structures on the α_1 -AGP molecule (68).

Local TNF bioactivity was not detected in any of the colon samples, even using a very sensitive bioassay (DL = 0,1 pg/ml). Although upregulation of TNF is demonstrated by several investigators (54-55), others also did not detect TNF bioactivity in colon or serum samples (58).

Systemic inflammatory parameters, including serum IL-6 and SAP levels again showed no significant differences between heterozygous and wt mice. IL-6 levels were significantly higher in homozygous transgenics compared to heterozygous transgenic and wt mice. SAP levels in the serum of homozygous transgenic mice were significantly higher than the levels of heterozygous and wt mice at day 4 and day 6 of DSS administration. Only 6 days after DSS administration, heterozygous transgenic and wt mice showed significantly increased SAP levels, compared to negative control mice. The increase in SAP levels are a clear indication of an acute phase reaction, which is seemingly earlier induced

in the homozygous transgenic mice. Again, we were not able to detect any TNF bioactivity in serum samples of the mice, in contrast to others (54-55) but in agreement with Olson *et al.* (58).

The numbers of bacteria in lung, liver and colon were significantly higher in homozygous compared to wt mice, 4 days after DSS administration. In spleen, there was an increase in bacterial load in the transgenic mice, although not significant. This observation is in agreement with the results of Lange *et al.* (69) who showed an increase in Gram-negative bacteria in liver and spleen in terminally ill animals. Egger *et al.* (62) already suggested that after the induction of toxic injury by DSS on the colonic epithelial cells, some bacterial organisms may invade the mucosa. Kreuzpaintner *et al.* (66) have observed an overrepresentation of IBD cases (44-fold) among patients with endocarditis and showed that IBD could be considered an independent risk factor for bacterial endocarditis. They also argued that bacteremia, as a result of increased permeability of the damaged mucosa might be the reason for this. Moreover, in acute DSS-colitis, treatment with antibiotics led to an improvement of the histological parameters (63). This suggests that an increase of bacterial load and loss of tolerance, leading to spreading of the bacteria in the tissues, contributes to the disease process. The abundant presence of α_1 -AGP may provide a rich source of food for *Viridans streptococci*, that are able to ferment sugar residues from the α_1 -AGP molecule (70-71). *Viridans streptococci* possibly are involved in the pathology of IBD, since bacterial antigens were found in synovial fluids from IBD patients (72). Strikingly, *Viridans streptococci* are the predominant organisms inducing infective endocarditis (73). A possible link still has to be investigated closer however.

In addition, α_1 -AGP has been shown to have antiphagocytotic effect on neutrophils (12) and to bind to IgG (74), which could also be an explanation for the higher bacterial load in the transgenic mice. Since α_1 -AGP is known to have an inhibitory effect on the activation of lymphocytes, we looked whether the increase in bacterial load in the

transgenic mice could be the effect of a decreased tolerance against the intestinal bacteria by measuring IgA levels. However, there was no difference in IgA levels between the 3 groups of mice. Macrophages probably play an important role in the acute DSS model, since they can phagocytose DSS, leading to activation of the macrophages (38, 54). This could contribute to the tissue damage. Since α_1 -AGP can stimulate macrophages to release pro inflammatory cytokines such as IL-1 (23), this could result in a positive feedback loop, whereby more macrophages and other inflammatory cells such as neutrophils are becoming activated and contribute to the tissue damage. Indeed, we have shown that locally, there was more MPO in the transgenic mice and this was a dose dependent effect. This is not in contradiction to the fact that the inflammatory infiltrate is only secondary to epithelial damage however. We hypothesize that DSS initially causes damage to the epithelium, resulting in recruitment and activation of inflammatory cells. The high local concentration of α_1 -AGP could have an exponential effect on cytokine release and could stimulate leukocyte recruitment and activation. The abundant presence of activated leukocytes could in turn contribute to the local tissue damage.

In conclusion, we have shown that α_1 -AGP transgenic mice have an increased susceptibility towards DSS-induced colitis, compared to wt mice. Clinically and systemically, there is hardly a significant difference in the parameters observed between heterozygous transgenic and wt mice. However, when looking at local parameters, such as MPO-levels and most importantly inflammation score, there was a dosage effect of the α_1 -AGP. Homozygous transgenic mice are more susceptible than heterozygous transgenic mice and the latter are clearly more susceptible to DSS-induced colitis than wt mice. So, it seems that local inflammatory parameters are more influenced by the presence of α_1 -AGP, since there is a dosage dependent effect, while this is not the case for systemic inflammatory parameters. We can only speculate about the reason of the increased

susceptibility of α ₁-AGP transgenic mice to DSS induced acute colitis. Since clinical signs of illness already appear much faster in the transgenic mice, we believe that α ₁-AGP is acting on a very early step in the onset of pathology of colitis. The antiphagocytotic effect of α ₁-AGP (12), leading to increased bacterial counts in the organs, and the fact that α ₁-AGP can stimulate the secretion of proinflammatory cytokines by macrophages (22-23) could certainly contribute to the higher susceptibility of the transgenic mice. α ₁-AGP is used as a marker for IBD (27-30). Moreover, it has been shown that in case of IBD there is a positive correlation between α ₁-AGP levels and risk of relapse (32-34). Our results suggest that high levels of α ₁-AGP can have a synergistic effect with stimuli which can evoke colitis.

¹**Acknowledgements.** This work was supported in part by the Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek-Vlaanderen (grant G023698N), and the Interuniversitaire Attractiepolen. T. H. is a fellow with the Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie. A. W. is a fellow with the Bijzonder Onderzoeksfonds, and W. VM. is a postdoctoral researcher at the Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek-Vlaanderen.

²Address correspondence and reprint requests to Dr. C. Libert, Department of Molecular Biology, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Ghent, Belgium. E-mail address: claude.libert@dmb.rug.ac.be

³Abbreviations used in this paper: DSS, dextran sodium sulphate; MPO, myeloperoxidase; IBD, inflammatory bowel disease; PBS, phosphate-buffered saline; SAP, serum amyloid P component; TNF, tumor necrosis factor; wt, wild type.

References

- Schmid, K. (1975) in *The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control* (Putman, F. W., ed) , pp. 183-192, Academic Press, New York
- Kushner, I., and Mackiewicz, A. (1993) in *Acute Phase Proteins: Molecular Biology, Biochemistry, and Clinical Applications* (Mackiewicz, A. , Kushner, I. , and Baumann, H., eds) , pp. 3-19, CRC Press, Boca Raton, FL
- Sarcione, E. J. (1963) *Arch. Biochem. Biophys.* 100, 516-518
- Sörensson, J., Matejka, G. L., Ohlson, M., and Haraldsson, B. (1999) *Am. J. Physiol.* 276, H530-H534
- Eap, C. B., Baumann, P., and Moretta, A. (1989) *Experientia (Basel)* 45, 52 (abstr.)
- Gahmberg, C. G., and Andersson, L. C. (1978) *J. Exp. Med.* 148, 507-521
- Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H., and Köhler, G. (1994) *Nature* 368, 339-342
- Baumann, H., and Gauldie, J. (1994) *Immunol. Today* 15, 74-80
- Costello, M., Fiedel, B. A., and Gewurz, H. (1979) *Nature* 281, 677-678
- Lainé, E., Couderc, R., Roch-Arveiller, M., Vasson, M. P., Giroud, J. P., and Raichvarg, D. (1990) *Inflammation* 14, 1-9
- Bennett, M., and Schmid, K. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 6109-6113
- van Oss, C., Gillman, C., Bronson, P., Border, J. (1974) *Immunol. Commun.* 3:321-328
- Moore, D. F., Rosenfeld, M. R., Gribbon, P. M., Winlove, C. P., and Tsai, C. M. (1997) *Inflammation* 21:69-82
- Muchitsch, E. M., Teschner, W., Linnau, Y., and Pichler, L. (1996) *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 331, 313-321
- Haraldsson, B., and Rippe, B. (1987) *Acta Physiol. Scand.* 129, 127-135
- Hocephied, T., Van Molle, W., Berger, F., Baumann, H., and Libert, C. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275:14903-14909

17. Daemen, M., Heemskerk, V., van't Veer, C., Denecker, G., Wolfs, T., Vandenabeele, P., and Buurman, W. (2000) *Circulation* 102:1420-1426
18. Muchitsch EM, Auer W, Pichler L (1998) *Fundam Clin Pharmacol* 12:173-181
19. Van Molle, W., Libert, C., Fiers, W., and Brouckaert, P. (1997) *J. Immunol.* 159, 3555-3564
20. Williams, J. P., Weiser, M. R., Pechet, T. T., Kobzik, L., Moore, F. D., Jr., and Hechtman, H. B. (1997) *Am. J. Physiol.* 273, G1031-G1035
21. Libert, C., Brouckaert, P., and Fiers, W. (1994) *J. Exp. Med.* 180, 1571-1575
22. Su, S.-J., Yang, B.-C., Wang, Y.-S., and Yeh, T.-M. (1999) *Immunopharmacology* 41:21-29
23. Boutten, A., Dehoux, M., Deschenes, M., Rouzeau, J.-D., Bories, P., and Durand, G. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2687-2695
24. Schmidt, M., Duncan, B., Sharrett, A., Lindberg, G., Savage, P., Offenbacher, S., Azambuja, M., Tracy, R., Heiss, G. (1999) *Lancet* 353:1649-1652
25. Patel, P., Patel, M., Raval, G., Rawal, R., Balar, D., Patel, D. (1998) *Am. J. Clin. Oncol.* 21:258-262
26. Sen, D., Sarin, G., Ghosh, B., Acharya, N., Gurha, N. (1992) *Acta Ophthalmol. (Copenh)* 70:515-517
27. Boirivant, M., Leoni, M., Tariciotti, D., Fais, S., Squarcia, O., Pallone, F. (1988) *J. Clin. Gastroenterol.* 10:401-405
28. André, C., Descos, L., Landais, P., and Fermanian, J. (1981) *Gut* 22:571-574
29. Buckell, N., Lennard-Jones, J., Hernandez, M., Kohn, J., Riches, P., and Wadsworth, J. (1979) *Gut* 20:22-27
30. Jensen, K., Jarnum, S., Koudahl, G., and Kristensen, M. (1976) *Scand. J. Gastroenterol.* 11:177-183
31. Marniemi, J., Jarvisalo, J., Toikka, T., Raiha, I., Ahotupa, M., Sourander, L. (1998) *Int. J. Epidemiol.* 27:799-807
32. Kjeldsen, J., Lauritsen, K., De Muckadell, O. (1997) *Scand. J. Gastroenterol.* 32:933-941
33. Wright, J., Alp, M., Young, G., and Tigler-Wybrandi, N. (1987) *Dig. Dig. Sci.* 32:164-170
34. Lubega, J., and Davies, T. J. (1990) *Clin. Chim. Acta* 188:59-69
35. Shanahan, F. (1994) *Ir. J. Med. Sci.* 163:544-549
36. Fiocchi, C. (1998) *Gastroenterology* 115B:182-205
37. Elson, C., Sartor, R., Tennyson, G., Riddell, R. (1995) *Gastroenterology* 109:1344-1367
38. Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. (1990) *Gastroenterology* 98:694-702
39. Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neiryck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W., and Remaut, E (2000) *Science* 289:1352-1355
40. Dewey, M. J., Rheaume, C., Berger, F. G., and Baumann, H. (1990) *J. Immunol.* 144, 4392-4398
41. Chan, J., and Yu, D. (1991) *Protein Express. Purif.* 2, 34-36
42. Kojouharoff, G., Hans, W., Obermeier, F., Mannel, D., Andus, T., Scholmerich, J., Gross, V., Falk, W. (1997) *Clin. Exp. Immunol.* 107:353-358
43. Bradley, P., Priebat, D., Christensen, R., Rothstein, G. (1982) *J. Invest. Dermatol.* 78:206-209

44. Espevik T, Nissen-Meyer J (1986) *J Immunol Methods* 95:99-105
45. Van Snick, J., Cayphas, S., Vink, A., Uyttenhove, C., Coulie, P., Rubira, M., and Simpson, R. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9679-9683
46. Taktak, Y. S., and Stenning, B. (1992) *Horm. Metab. Res.* 24:371-374
47. Cooper, H., Murthy, S., Kido, K., Yoshitake, H., Flanigan, A. (2000) *Carcinogenesis* 21:757-768
48. Egger, B., Bajaj-Elliott, M., MacDonald, T., Inglin, R., Eysselein, V., Buchler, M. (2000) *Digestion* 62:240-248
49. Stahlberg, D., Veress, B., Mare, K., Granqvist, S., Agren, B., Richter, S., and Lofberg, R. (1997) *Am. J. Gastroenterol.* 92:283-288
50. Kitajima, S., Takuma, S., Morimoto, M. (1999) *Exp. Anim.* 48:137-43
51. Leung, F., Heng, M., Allen, S. et al. (1997) *Gastroenterology (Suppl)* 112:A1026
52. Ni, J., Chen, S., and Hollander, D. (1996) *Gut* 39:234-241
53. Takizawa, H., Shintani, N., Natsui, M., Sasakawa, T., Nakakubo, H., Nakajima, T., and Asakura, H. (1995) *Digestion* 56:259-264
54. Dieleman, L., Ridwan, B., Tennyson, G., Beagley, K., Bucy, R., Elson, C. (1994) *Gastroenterology* 107:1643-1652
55. Murano, M., Maemura, K., Hirata, I., Toshina, K., Nishikawa, T., Hamamoto, N., Sasaki, S., Saitoh, O., and Katsu, K. (2000) *Clin. Exp. Immunol.* 120:51-58
56. Marrero, J., Matkowskyj, K., Yung, K., Hecht, G., and Benya, R. (2000) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278:G797-804
57. Arai, Y., Takanashi, H., Kitagawa, H., Okayasu, I. (1998) *Cytokine* 10:890-896
58. Olson, A., DelBuono, E., Bitar, K., Remick, D. (1995) *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 21:410-418
59. van Dullemen, H., van Deventer, S., Hommes, D., Bijl, H., Jansen, J., Tytgat, G., and Woody, J. (1995) *Gastroenterology* 109:129-135
60. Herfarth, H., Brand, K., Rath, H., Rogler, G., Scholmerich, J., Falk, W. (2000) *Clin. Exp. Immunol.* 120:59-65
61. Egger, B., Buchler, M., Lakshmanan, J., Moore, P., Eysselein, V. (2000) *Scand. J. Gastroenterol.* 35:1181-1187
62. Egger, B., Procaccino, F., Lakshmanan, J., Reinshagen, M., Hoffman, P., Patel, A., Reuben, W., Gnanakkan, S., Liu, L., Barajas, L., and Eysselein, V. (1997) *Gastroenterology* 113:825-832
63. Mashimo, H., Wu, D., Podolsky, D., Fishman, M. (1996) *Science* 274:259-265
64. Powrie, F., and Leach, M. (1995) *Ther. Immunol.* 2:115-123
65. Brandwein, S., McCabe, R., Cong, Y., Waites, K., Ridwan, B., Dean, P., Ohkusa, T., Birkenmeier, E., Sundberg, J., and Elson, C. (1997) *J. Immunol.* 159:44-52
66. Kreuzpaintner, G., Horskotte, D., Heyll, A., Losse, B., and Strohmeyer, G. (1992) *Am. J. Med.* 92:391-395
67. Hans, W., Scholmerich, J., Gross, V., and Falk, W. (2000) *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 12:267-273
68. Havenaar, E., Hoff, R., van den Eijnden, D., and van Dijk, W. (1998) *Glycoconj. J.* 15:389-395
69. Lange, S., Delbro, D., Jennische, E., and Mattsby-Baltzer, I. (1996) *APMIS* 104:823-833

70. Byers, H., Tarelli, E., Homer, K., and Beighton, D. (1999) *Glycobiology* 9:469-479

71. Byers, H. L., Tarelli, E., Homer, K. A., Hambley, H., and Beighton, D. (1999) *J. Dent. Res.* 78:1370-1380

72. Baker, S. J., Jacob, E., and Bowden, G. H. (2000) *Scand. J. Gastroenterol.* 35:287-292

73. Dyson, C., Barnes, R. A., and Harrison, G. A. (1999) *J. Infect.* 38:87-93

74. Wroblewski, Z., and Mejsbaum-Katzenellenbogen, W. (1984) *Acta Biochim. Pol.* 31:17-24

III.3. BESPREKING

Inflammatoir darmlijden (IBD) is een verzamelnaam voor een aantal gastroïntestinale aandoeningen, waarvan de ziekte van Crohn en ulceratieve colitis de voornaamste zijn. Terwijl de ziekte van Crohn zich kan manifesteren over het volledige gastroïntestinaal kanaal, en een gevlekt patroon vertoont met vaak transmurale inflammatie, beperkt ulceratieve colitis zich tot het colon, waar de pathologie een continu patroon vertoont met inflammatie van enkel de bovenste lagen van de darm. IBD treft vooral jonge mensen; de eerste ziekte verschijnselen doen zich voor tussen de leeftijd van 15 en 30 jaar. De oorzaak van de ziekte is voorlopig nog niet gekend. Wat wel duidelijk is, is dat zowel genetische als omgevingsfactoren een belangrijke rol spelen. Naast de meer gekende chronische vorm van colitis, is er echter ook een acute vorm te onderscheiden. Acute colitis treedt bij de mens vooral op na infectie met pathogenen, na intoxicatie met eroderende chemicaliën en in nog een aantal andere gevallen van 'obscure oorsprong' (Stein *et al.*, 2001; Sacco *et al.*, 2000). Een acute vorm van colitis treedt eveneens op bij zogenaamde 'relaps', het terug actief worden van de ziekte na een periode van relatieve rust. Aangezien een relaps redelijk plots en onverwachts optreedt, is men gaan zoeken naar parameters die men kon meten in het serum, die een indicatie konden geven over het al dan niet optreden van een relaps, zodat men reeds preventief kon beginnen behandelen. Zo is er ondermeer een rechtstreeks verband gevonden tussen een hoge serumconcentratie AGP en een verhoogde kans op het optreden van een relaps (Kjeldsen *et al.*, 1997; Lubega *et al.*, 1990; Wright *et al.*, 1987). Om na te gaan wat het effect is van hoge serumconcentraties op het optreden van een relaps, werd een acute colitis opgewekt in AGP transgene muizen, die continu hoge concentraties AGP in het serum produceren. Dit heeft tot een aantal verrassende resultaten geleid.

Acute colitis werd opgewekt door 2% DSS toe te dienen in het drinkwater van de muizen. Alhoewel in de meeste publicaties een hoger percentage DSS toegediend wordt (meestal 5%), bleek dit in ons geval veel te aggressief te zijn en al na enkele dagen te leiden tot letaliteit (resultaten niet weergegeven). Bij het uittesten van verschillende concentraties DSS, bleek 2% te volstaan om op een vlugge en reproduceerbare manier een acute colitis op te wekken. Er zijn verschillende mogelijke verklaringen waarom in de ene onderzoeksgroep 5% en in de andere veel minder DSS gebruikt wordt. Vooreerst speelt de genetische achtergrond van de muizen een rol. In ons geval is dit C57BL/6. In een bepaalde publicatie werd echter aangehaald dat C57BL/6 een stam is die relatief resistent is aan DSS-geïnduceerde colitis (Mähler *et al.*, 1999). Er zijn ook nog een aantal andere factoren die een rol spelen, zoals het water waarin het DSS opgelost wordt. DSS opgelost in gewoon kraantjeswater geeft betere resultaten (meer inflammatie) dan wanneer het opgelost wordt in gedestilleerd water (Wolfgang Hans, mondelinge mededeling). De samenstelling van het kraantjeswater verschilt

echter van streek tot streek en zeker van land tot land. Ook de microbiële status van het animalarium speelt een grote rol. Zo zal DSS-geïnduceerde colitis zich minder snel en prominent ontwikkelen in een SPF-faciliteit dan in een conventioneel animalarium, zoals bij ons het geval is. Dit is niet zo verwonderlijk, omdat al meerdere malen aangetoond is dat de microbiële flora van de muis een belangrijke en mogelijk een cruciale rol speelt in de ontwikkeling van IBD (Hans *et al.*, 2000; Cong *et al.*, 1998).

De klinisch waarneembare parameters die optreden bij acute DSS-geïnduceerde colitis zijn gewichtsverlies en bloederige stoelgang of in een verder gevorderd stadium rectale bloeding. Een derde parameter die gemeten werd was de overleving. De homozygoot transgene muizen bleken significant sneller gewichtsverlies te leiden en rectale bloeding te vertonen dan de heterozygoot transgene en wt muizen. Tussen deze beide laatste groepen was er nauwelijks of geen verschil waar te nemen. Dezelfde waarneming werd gedaan wat betreft de overleving van de muizen. De homozygote transgene muizen sterven significant sneller dan de heterozygoot of wt muizen, waar geen verschil tussen te zien is.

Wat betreft de klinisch waarneembare parameters is er dus blijkbaar enkel een verschil waarneembaar vanaf een bepaalde basisconcentratie AGP, die enkel voldoende hoog is bij de homozygoot transgene muizen.

Wanneer echter gekeken wordt naar de lokale inflammatoire parameters, zoals de aanwezigheid van geactiveerde neutrofielen (MPO-meting) of de inflammatoire score van darmcoupes (die trouwens dubbel blind gescoord werden), dan is wel degelijk een dosis effect van het AGP te zien. Heterozygoot transgene muizen hebben intermediaire MPO-waarden en een intermediaire inflammatoire score in vergelijking met de homozygoot transgene muizen (hoogste waarden) en de wt muizen (laagste waarden).

Bij de systemisch inflammatoire parameters (IL-6 en SAP-meting in het serum) daarentegen, is er opnieuw geen dosis effect meer te zien.

Samengevat kan dus gesteld worden dat AGP transgene muizen gevoeliger zijn aan de ontwikkeling van DSS-geïnduceerde acute colitis. De hogere gevoeligheid van de heterozygoot transgene muizen is echter enkel lokaal merkbaar en resulteert niet in een vervroegd optreden van klinische parameters of hogere niveaus van systemisch inflammatoire parameters in vergelijking met wt muizen. Dit impliceert dat klinische of systemische inflammatoire parameters niet rechtstreeks in verband staan met de ernst van de lokale aandoening en dus ook niet als maatstaf voor de graad van de lokale inflammatie kunnen gebruikt worden.

Door bepaalde auteurs werd reeds gesuggereerd dat door beschadiging van het mucosa de vasculaire permeabiliteit zou verhogen en bepaalde bacteriën zich op deze manier in het organisme kunnen verspreiden (Egger *et al.*, 1997). Er is inderdaad al aangetoond dat er een verhoging is in het aantal Gram-negatieve bacteriën in lever en milt van terminaal zieke

dieren die aan IBD leiden (Lange *et al.*, 1996). Bovendien is er een verband gevonden tussen IBD en het optreden van infectueuze endocarditis. Onder de patiënten met endocarditis werden abnormaal veel gevallen van IBD vastgesteld (Kreuzpaintner *et al.*, 1992).

Wij hebben inderdaad ook vastgesteld dat in verscheidene organen bacteriën terug te vinden waren, en dat het aantal bacteriën ook min of meer in verband stond met de concentratie AGP. M.a.w., de meeste bacteriën waren terug te vinden bij de homozygoot transgene muizen, terwijl er het minst waren bij de wt muizen. De heterozygoot transgene muizen hadden intermediaire niveaus, hoewel dit enkel in de long op een statistisch significante manier tot uiting kwam. Dit kan mogelijks rechtstreeks in verband gebracht worden met de lokale darmschade, die eveneens afhankelijk blijkt te zijn van de concentratie AGP. Aansluitend daarbij kon het zijn dat de aanwezigheid van hoge concentraties AGP ervoor zorgt dat de tolerantie in de darm gereduceerd wordt, waardoor bacteriën zich gemakkelijker zouden kunnen verspreiden in het organisme. Gereduceerde tolerantie zou kunnen te wijten zijn aan inhibitie van B-cel activatie en proliferatie door AGP (Bennet en Schmid, 1980). Via meting van IgA niveaus in de darm is echter gebleken dat er geen verschil is tussen de verschillende groepen van muizen. Het antifagocytotisch effect van AGP (Van Oss *et al.*, 1974) zou eventueel ook kunnen bijdragen tot de hogere bacteriële aanwezigheid in de organen.

Aangezien er reeds heel vroeg tijdens de ontwikkeling van acute DSS-geïnduceerde colitis een verschil te zien is in de homozygoot AGP transgene muizen lijkt het waarschijnlijk dat AGP reeds een negatieve invloed uitoefent op een van de primaire stappen in de ontwikkeling van de acute colitis. Een verklaring vinden voor het sensitiserend effect van AGP op de lokale inflammatie en de darmschade is echter niet voor de hand liggend, aangezien het mechanisme van DSS-geïnduceerde colitis nog niet opgehelderd is. DSS is cytotoxisch voor de epitheelcellen van het colon (Ni *et al.*, 1996); het inflammatoire infiltraat is bijgevolg slechts secundair aan de epitheelschade (Cooper *et al.*, 1993). Muizen die deficiënt zijn in bepaalde centrale mediators die instaan voor de bescherming of herstelmechanismen van het mucosa, zoals EGF-receptor en TGF α , zijn veel gevoeliger voor DSS-geïnduceerde colitis (Egger *et al.*, 2000; Egger *et al.*, 1997; Mashimo *et al.*, 1996). Dit geldt ook voor muizen die deficiënt zijn in factoren die belangrijk zijn in het behoud van de structurele integriteit van het colon, zoals trefoil factor. Merkwaardig genoeg echter speelt AGP eveneens een belangrijke rol in behoud van de capillaire permeabiliteit, via zijn interactie met het endotheel. Macrofagen spelen waarschijnlijk ook geen onbelangrijke rol in dit model, aangezien deze DSS kunnen fagocyteren en daardoor geactiveerd worden (Okayasu *et al.*, 1990). Dit zou in belangrijke mate kunnen bijdragen tot de weefselschade. Aangezien AGP macrofagen kan stimuleren tot de vrijstelling van pro-inflammatoire

cytokines (Boutten *et al.*, 1992), zou er een positieve terugkoppeling kunnen ontstaan waarbij steeds meer macrofagen en andere cellen, zoals neutrofielen, geactiveerd worden en bijdragen tot de weefselschade. We hebben inderdaad aangetoond dat er lokaal meer MPO (een maat voor neutrofiel activatie) aanwezig was in de transgene muizen en dat dit effect dosis afhankelijk was. Dit is niet in tegenspraak met het feit dat het inflammatoir infiltraat slechts secundair zou zijn aan de de epitheelschade. Onze hypothese is dat DSS initieel schade veroorzaakt aan het epitheel, waardoor inflammatoire cellen gerecruteerd en geactiveerd worden. De hoge concentratie AGP zou ervoor kunnen zorgen dat er een exponentiële vrijstelling is van inflammatoire cytokines, resulterend in een amplificatie van leukocyt recrutering en activatie. De overvloedige aanwezigheid van geactiveerde leukocyten zou dan op zijn beurt verantwoordelijk zijn voor een nog grotere weefselschade.

HOOFDSTUK IV – ONDERZOEK NAAR DE BETROKKENHEID VAN α_2 - MACROGLOBULINE TIJDENS TUMOR NECROSIS FACTOR, GRAM-NEGATIEVE EN LIPOPOLYSACCHARIDE GEMEDIEERDE SHOCK

IV.1. INLEIDING

Gram-negatieve infectie, LPS- en TNF-injectie leiden allemaal tot een systemisch inflammatoir respons syndroom (SIRS), vaak met de dood tot gevolg. Deze drie inflammatoire modellen hebben duidelijke raakpunten met elkaar: LPS is de meest bioactieve component van de Gram negatieve celwand. Tijdens Gram-negatieve infectie komt er ook LPS vrij (van afgestorven bacteriën bijvoorbeeld). TNF is een belangrijke mediator tijdens Gram-negatieve, maar ook tijdens LPS-geïnduceerde shock. Zo kan passieve immunisatie met antilichamen tegen TNF beschermen tegen LPS geïnduceerde shock (Beutler *et al.*, 1985) en tegen letale bacteremie in apen (Tracey *et al.*, 1987). Er zijn echter ook duidelijke verschillen tussen de drie modellen, waardoor ze zeker als verschillende modellen moeten beschouwd worden: zo zijn Gram-negatieve bacteriën meer dan enkel hun LPS. Bacteriën vermenigvuldigen en verspreiden zich, produceren soms een slijmkapsel dat ze beschermt tegen fagocytose; hebben vaak pili aan hun oppervlak waarmee ze zich ergens kunnen vasthechten; ze kunnen exotoxines produceren, proteasen,... Gram-negatieve bacteriën en LPS hebben ook niet TNF als enige mediator die leidt tot de ontwikkeling van een shocksyndroom. TNF of TNFRI-deficiënte muizen zijn bijvoorbeeld niet beschermd tegen LPS-gemedieerde shock en zijn zelfs hypergevoelig aan een bacteriële infectie (Amiot *et al.*, 1997; Rothe *et al.*, 1993; Pfeffer *et al.*, 1993). Dus, hoewel TNF een belangrijk pro-inflammatoire mediator is tijdens bacteremie, is TNF ook belangrijk voor de verdediging tegen een bacteriële infectie.

Door onze onderzoeksgroep werd eerder reeds aangetoond dat bepaalde acute fase eiwitten waarschijnlijk een belangrijke rol spelen tijdens systemische inflammatie, aangezien AGP bescherming biedt tegen TNF-geïnduceerde letaliteit (Libert *et al.*, 1994). Er kon echter geen bescherming opgewekt worden tegen LPS-gemedieerde letaliteit, wat een bijkomend argument is dat er naast TNF ook nog een alternatieve pathway is langs dewelke LPS tot letaliteit kan leiden. In dit hoofdstuk werd de rol onderzocht van α_2 -macroglobuline, een breed spectrum protease inhibitor, zowel in TNF als in LPS-geïnduceerde en in Gram-negatieve letale shock.

IV.2. RESULTATEN

IV.2.1. 'Differential response of α_2 -macroglobulin-deficient mice in models of lethal TNF-induced inflammation'

Tino Hochepped, Paul Ameloot, Peter Brouckaert, Fred Van Leuven, and Claude Libert.
Eur Cytok Netw 11:597-601, 2000

Differential response of α_2 -macroglobulin-deficient mice in models of lethal TNF-induced inflammation

Tino Hochepped¹, Paul Ameloot¹, Peter Brouckaert¹, Fred Van Leuven² and Claude Libert¹

1. Department of Molecular Biology, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology and Ghent University, Ghent, Belgium

2. Department of Human Genetics, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology and Catholic University of Leuven, Leuven, Belgium

Correspondence: Dr. C. Libert, Department of Molecular Biology, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Ghent, Belgium. Tel: 32-9264-5131, Fax: 32-9264-5348, e-mail address: claude.libert@dmb.rug.ac.be.

ABSTRACT. Tumor necrosis factor (TNF) is an essential mediator in the pathogenesis of Gram-negative septic shock. Injection of TNF into normal mice leads to systemic, lethal inflammation, which is indistinguishable from lipopolysaccharide (LPS)-induced lethal inflammation. α_2 -macroglobulin (A2M) is a major positive acute phase protein with broad-spectrum protease-inhibitory activity. Mouse A2M-deficient (MAM^{-/-}) mice were significantly protected against lethal systemic inflammation induced by TNF. The protection is not due to faster clearance of the injected TNF. The induction of tolerance to TNF-induced lethality by repetitive administration of small doses of human TNF for five consecutive days was equally efficient in both mutant mice compared to wild-type mice. In D-(+)-galactosamine (GalN)-sensitized mice, TNF induces lethal inflammatory hepatitis. MAM^{-/-} mice are equally sensitive to the lethal combination of TNF/GalN. Furthermore, interleukin-1-induced desensitization to TNF/GalN was not impaired in MAM^{-/-} mice. We conclude that MAM plays a mediating role in TNF-induced lethal shock and that MAM deficiency does not reduce changes in efficiency of tolerance and desensitization to TNF and TNF/GalN-induced lethality, respectively.

Keywords: TNF, shock, acute phase, inflammation, α_2 -macroglobulin.

INTRODUCTION

α_2 -macroglobulin (A2M) is a typical acute phase protein in several mammalian species, such as rabbit, rat and mouse [1, 2]. In humans, A2M does not behave as an acute phase protein [1], and A2M levels in man are not diagnostic for disease [3]. Its synthesis increases several-fold upon stimulation of rabbits or rats with inducers of an acute phase reaction, *e.g.* turpentine oil, or cytokines, *e.g.* interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) [4-6]. The exact role of A2M is not known. However, A2M has several interesting biological properties. A2M is a broad-spectrum protease inhibitor, capable of inhibiting proteinases from all classes by steric trapping. After cleavage of a peptide bond in the bait region by the protease, A2M changes its conformation, which allows trapping of the protease, its binding to the A2M receptor, and elimination from the circulation [7]. Furthermore, A2M can bind covalently with several cytokines and growth factors, such as IL-1 [8], IL-6 [9], bFGF [10], TGF- β [11], NGF [12], PDGF [13]. The binding to A2M does not lead to reduced activity of the cytokine or growth factor. However, binding to A2M may have effects on the pharmacokinetics and bio-availability of the hormones [14]. They could also explain the immunomodulatory and growth-promoting activities assigned to A2M [15]. Several groups have described the anti-inflammatory effects of A2M, for example in D-

(+)-galactosamine (GalN)-induced hepatitis [16], in burn trauma [17], anaphylactic shock [18] and in inflammation caused by histamine, bradykinin or prostaglandins [19]. Furthermore, A2M inhibits PMN chemotaxis [20] and influenza virus infection [21]. Mouse A2M (MAM) has been knocked out in mice, without gross effects on viability [22], which was somewhat surprising since no deficiency of A2M in humans is known, suggesting a vital function [14].

TNF is a proinflammatory cytokine, which also has very promising antitumor activities [23-26]. Injection of TNF into cancer patients causes shock-like phenomena, characterized by a drop in blood pressure, bowel necrosis and liver failure [27]. TNF is also a central mediator in bacterial shock and in several other important diseases, such as arthritis and inflammatory bowel disease [28].

In this study, we were interested to know the effect of the absence of MAM on TNF-induced lethality. We have found earlier that serine protease inhibitors confer protection against TNF-induced lethality [29, 30] and hence we wondered to what extent endogenous levels of the protease-inhibiting A2M are involved in protection against shock. We also studied the role of A2M on the induction of either desensitization, which is mediated by a liver-borne protein [31], or tolerization.

MATERIALS AND METHODS

Mice. C57BL/6 mice were purchased from Harlan Olac (Blackthorn, UK) and were bred on in our animal facility. MAM^{-/-} mice were generated by gene targeting in ES cells [22]. Mutant mice were backcrossed 7 generations in C57BL/6 using C57BL/6 mice from Harlan Olac. After backcrossing, the mice (which were > 99% C57BL/6) were intercrossed, and homozygous knockouts were further bred as brother-sister couples. All mice were kept in a conventional mouse room in 12 hours light/dark cycles and received food and water *ad libitum*. Female mice were used at the age of 8 weeks. At that age all mice had a comparable body weight.

Cytokines and reagents. Recombinant murine TNF (mTNF), human TNF (hTNF) and murine IL-1 β (mIL-1 β) were expressed in, and purified from *Escherichia coli* in our laboratories. mTNF had a specific activity of 1.0×10^9 IU/mg and contained < 0.02 ng endotoxin/mg protein. hTNF had a specific activity of 1.8×10^7 IU/mg and contained < 10 ng endotoxin/mg protein. The IL-1 preparation contained 0.8 ng endotoxin/mg protein. GalN was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Endotoxin levels were assessed by a chromogenic *Limulus* amoebocyte lysate assay (Coatest; Chromogenix, Stockholm, Sweden).

Injections and measurement of body temperatures.

All reagents were diluted in pyrogen-free PBS prior to injection. I.p. and i.v. injections had a volume of 0.5 ml and 0.25 ml, respectively. For cytokine determinations, blood was withdrawn at the orbital plexus under light ether anesthesia. Rectal body temperatures were measured with an electronic thermometer (model 2001; Comark Electronics, Littlehampton, UK).

Measurement of blood parameters. TNF was measured by the cytotoxic assay on WEHI 164 clone 13 cells, as described [32]. Briefly, serial dilutions of samples and TNF standards were incubated with the cells in 96-well microtiter plates (30,000 cells/well) in the presence of 1 μ g/ml of actinomycin D. After 18 hours of incubation, the number of surviving cells was determined by an MTT colorimetric assay.

Statistics. Mean values and SD were compared using an unpaired Student's t-test, with Welch's correction in the case of nonhomogeneous variances. Survival curves (Kaplan-Meier plots) were compared using a log-rank test, and final outcomes using a chi² test. *, ** and *** represent $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

RESULTS

A2M plays no significant role in TNF-induced hepatitis or in desensitization.

As we previously demonstrated that the induction of lethal hepatitis by the combination of TNF/GalN is mediated by a serine protease, we wondered whether the absence of A2M would sensitize mice to TNF/GalN [29]. The experiment represented in Table 1 was performed: control C57BL/6 and MAM^{-/-} mice were injected with increasing doses of TNF, in combination with 20 mg GalN. The doses ranged from

nonlethal to LD₈₀. We found that MAM^{-/-} mice were neither sensitized to the lethal effect, nor protected (Table 1).

In order to study whether A2M is involved in the induction of desensitization, the experiment shown in Figure 1 was performed. Mice (n = 10) were given increasing doses of mIL-1 β , and were challenged with 0.5 μ g TNF/20 mg GalN 12 hours later. Lethality is presented in Figure 1A. It is clear that both C57BL/6 and MAM^{-/-} mice are not protected by the lowest dose of IL-1 (1 ng); 10 ng IL-1 and 100 ng IL-1 protected intermediately and completely, respectively. No statistically significant difference between the two types of

Table 1
Induction of lethality by TNF/GalN in C57BL/6 and MAM^{-/-} mice

Dose TNF/mouse ^a	Lethality ^b C57BL/6	Lethality MAM ^{-/-}
0.01 μ g	0/6	0/9 ^{NS}
0.03 μ g	6/13	2/11 ^{NS}
0.1 μ g	8/13	10/12 ^{NS}
0.3 μ g	11/13	13/13 ^{NS}

^a Given i.p. in combination with 20 mg GalN.

^b Number of dead mice over total scored at 24 hours after challenge (no further deaths occurred). NS means not significantly different from C57BL/6 mice.

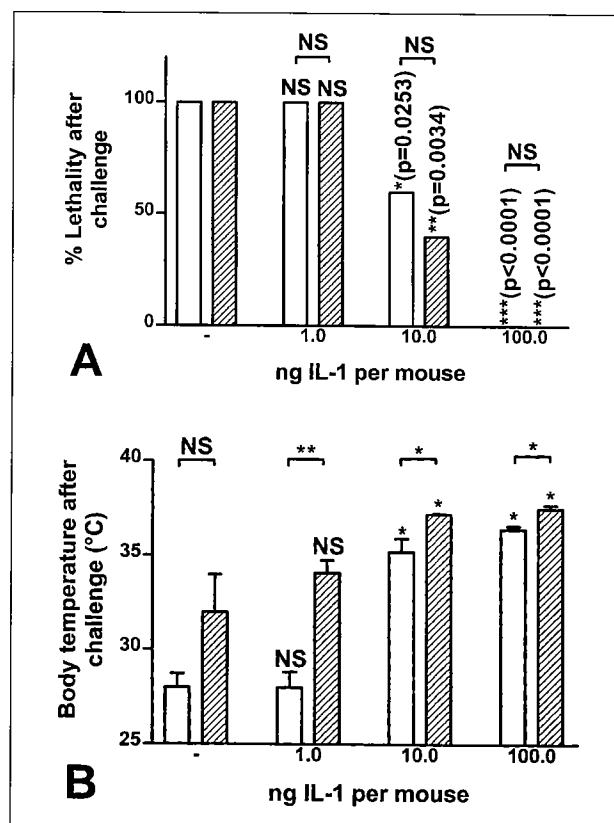


Figure 1
Desensitization to 0.5 μ g TNF/20 mg GalN by increasing doses of mIL-1 β (1, 10 and 100 ng), given 12 hours before the challenge. (A) Lethality was scored up to 48 hours after challenge (n = 10; no further deaths occurred). (B) Body temperature measured 6 hours after challenge. Open bars represent C57BL/6 mice, and hatched bars MAM^{-/-} mice.

mice was found. When the drop in body temperature was measured 6 hours after the TNF/GalN challenge, it was found that both C57BL/6 and MAM^{-/-} mice were protected in a dose-response pattern (IL-1 alone had no effect on body temperature in both wild-type and knockout mice). However, body temperatures were slightly, but significantly, higher in MAM^{-/-} mice compared to C57BL/6 controls (Figure 1B). We conclude that the absence of A2M does not cause a reduction in the desensitizing ability of IL-1 to lethal shock.

MAM^{-/-} mice are less sensitive to mTNF. Injection of mTNF leads to lethal systemic inflammation [33, 34]. Also in this model, evidence was collected for a mediatory role of a serine protease [29]. We performed two independent experiments using a dose of mTNF of 10 μ g per mouse. For this preparation of TNF, the dose was LD₈₀. In the first experiment, the final numbers of dead mice over the total were 11/16 and 8/19 for C57BL/6 and MAM^{-/-}, respectively. In the second experiment we found 11/11 and 4/24, respectively. The sum of both experiments is shown in Figure 2. MAM^{-/-} mice are very significantly protected against mTNF-induced lethality ($p < 0.0001$). When studying the biologically active amount of mTNF after injection into C57BL/6 or MAM^{-/-} mice, it was seen that no changes in kinetics occurred in MAM^{-/-} mice (Figure 3).

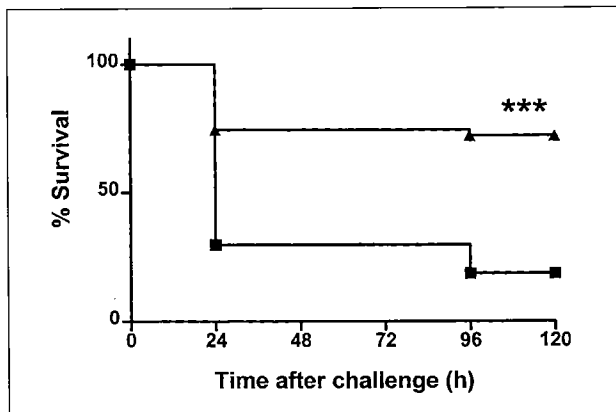


Figure 2

Lethal response of C57BL/6 mice (■; n = 27) and MAM^{-/-} mice (▲; n = 43) to an injection of mTNF (10 μ g per mouse). Lethality was scored up to 120 hours after challenge.

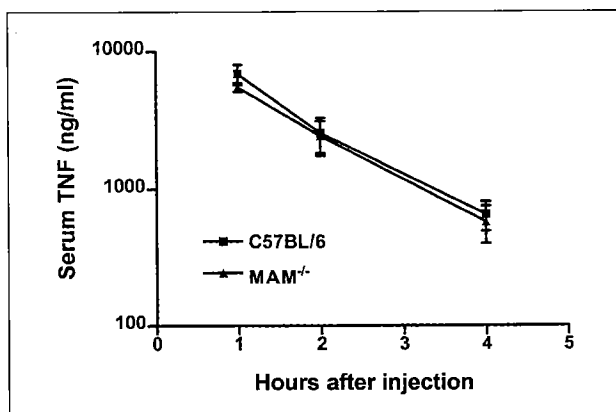


Figure 3

Clearance of mTNF from the serum after injection of mTNF into C57BL/6 mice (■; n = 3) and MAM^{-/-} mice (▲; n = 3).

Daily administration of small amounts of hTNF for 5 consecutive days causes tolerance to the lethal effects of mTNF for up to 2 weeks [25]. We were interested to know whether A2M was involved in the establishment of this tolerance. C57BL/6 and MAM^{-/-} mice were tolerized from day 1 to day 5 and challenged with 25 μ g mTNF on day 7. This dose of mTNF appeared to be lethal for C57BL/6 as well as MAM^{-/-} mice. However, all mice treated with hTNF were tolerized (Table 2). So, tolerization is still possible in the absence of A2M.

Table 2
Induction of tolerance in C57BL/6 and MAM^{-/-} mice

Mice	Pretreatment ^a	Lethality ^b
C57BL/6	PBS	6/6
C57BL/6	hTNF (2 μ g)	0/6*** (p = 0.0005)
MAM ^{-/-}	PBS	6/6
MAM ^{-/-}	hTNF (2 μ g)	0/6*** (p = 0.0005)

^a Given i.p. twice a day for 5 days (9 a.m. and 6 p.m.).

^b Number of dead mice over total scored until 72 hours after challenge with 25 μ g mTNF (no further deaths occurred). The significant difference compared with the PBS-treated group was evaluated.

DISCUSSION

Septic shock is the result of an overwhelming Gram-negative bacterial infection [36]. The bacteria and/or their lipopolysaccharides (LPS) are found in the circulation, and shock is the result of the combined action of several pro-inflammatory cytokines induced in macrophages and other cells [37]. Septic shock and sepsis, leading to cardiovascular depression and multiple organ failure, cause more than 100,000 casualties per year in the US [38]. Several clinical trials had the pro-inflammatory cytokines as a target: the IL-1R antagonist, soluble TNF receptors or TNF-neutralizing antibodies were used. These approaches and also those inhibiting platelet-activating factor or bradykinin were relatively disappointing [39]. Clearly new and other approaches are needed.

However, several points of evidence suggest that TNF is a central mediator in septic shock or in LPS-induced lethal shock. First, passive immunization with antibodies raised against mTNF conferred complete protection against LPS-induced lethality [34]. Secondly, LPS induces circulating TNF [28]. Finally, injection of TNF into experimental animals leads to a lethal shock which is very reminiscent of LPS-induced shock [40]. However, other data suggest that TNF is not the central mediator as TNF-deficient mice, as well as TNF-receptor p55-deficient mice, were not protected against LPS [41, 42].

We are studying the mechanism by which TNF causes lethality in several mouse models. In a first model, mice are treated with TNF and GalN, a liver-specific transcription and translation blocking agent [43]. In this model, mice die from inflammatory hepatitis, characterized by necrosis and apoptosis of hepatocytes [44]. In a second model, TNF is injected into normal mice,

which die from systemic inflammation [40, 45]. We and others have described that acute phase proteins have protective properties in lethal inflammation. We reported that a single injection of IL-1 leads to a period of desensitization of about 12-24 hours and that this desensitization appears to be mediated by (a) liver-derived factor(s) [31]. We found that two acute phase proteins, namely α_1 -acid glycoprotein and α_1 -antitrypsin, indeed conferred very significant protection against TNF/GalN and TNF-induced lethality [29, 46]. None of these proteins, however, protected against LPS, although α_1 -acid glycoprotein protects against a lethal Gram-negative infection with *K. pneumoniae* [47]. The biological role of α_1 -acid glycoprotein is not known, but the function of α_1 -antitrypsin is very clear as it is a broad-spectrum serine protease inhibitor [48].

A2M is also an acute phase reactant in many species [1, 2]. In humans, it appears to be an essential protein as no A2M deficiencies are known [14]. A2M has been clearly shown to be involved in the pathogenesis of Alzheimer disease [49]. Furthermore, several papers have reported the protective activities of A2M, for example in GalN-induced hepatitis [16], in burn trauma [17], in anaphylactic shock [18] and in inflammation caused by histamine, bradykinin or prostaglandins [19]. Furthermore, A2M inhibits PMN chemotaxis [20] and influenza virus infection [21]. Because A2M has broad-spectrum (pan) protease-inhibitory activities, we were interested to study whether A2M has a protective role in our inflammation models. To this end, we used A2M-deficient ($MAM^{-/-}$) mice, recently generated by gene targeting. These $MAM^{-/-}$ mice were shown to be perfectly healthy. They were more sensitive to a choline-free diet supplemented with ethionine and were found to be protected against an LD₅₀ of LPS [22].

We here describe that $MAM^{-/-}$ mice were equally sensitive to the combination of TNF/GalN as C57BL6 control mice and that they could also be desensitized by a single injection with IL-1. IL-1 injection leads to a short period of desensitization (12-24 hours), which is induced in hepatocytes [31]. These data illustrate that the absence of A2M has no influence on the sensitivity to TNF-induced lethal hepatitis or on the induction of short-term protection against this hepatitis by IL-1. If the process of desensitization, which is mediated by the liver, is mediated by acute phase proteins, then clearly A2M is not a candidate mediator.

We found that $MAM^{-/-}$ mice were significantly protected in the model of systemic inflammation using TNF injection. Apparently, the absence of A2M protects the animals; this suggests that A2M plays a rather mediating role in the pathogenesis. One possible explanation could be that A2M binds to the injected TNF, as previously shown, and that by doing so it causes a prolonged presence of TNF bioactivity in the serum. However, when we compared the kinetics of disappearance of TNF bioactivity from the serum upon TNF injection, we found no differences between $MAM^{-/-}$ and wild-type animals. Interestingly, our data confirm the protection of $MAM^{-/-}$ mice against LPS as described previously [22]. So far, it is not clear how A2M contributes to TNF-

induced lethal inflammatory shock. Possibly, A2M may bind and stabilize other cytokines which play a mediating role in TNF-induced pathology, such as IL-1 or IL-6. By binding to A2M, these cytokines may persist longer during systemic inflammation and contribute to the lethal outcome [14]. Protection of mice by tolerization was also found not to be impaired in $MAM^{-/-}$ mice.

Our data indicate that A2M has no role in TNF-induced hepatitis, but a rather mediating role in TNF-induced systemic inflammatory shock, and that A2M is not needed to establish the protective states of desensitization or tolerance to TNF.

Accepted for publication: 29/08/00

ACKNOWLEDGEMENTS. This work was supported by the Algemene Spaar en Lijfrentekas, the Interuniversitaire Attractiepolen, and the Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek-Vlaanderen. T.H. is a fellow with the Vlaams Instituut voor de Bevordering van het Wetenschappelijk-technologisch Onderzoek in de Industrie. P.B. is a research associate with the Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek-Vlaanderen. The authors thank F. Duerinck for preparing recombinant TNF, as well as M. van den Hemel, W. Burm and E. Spruyt for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Kushner I, Mackiewicz A. 1993. The acute phase response: an overview. In: Mackiewicz A, Kushner I, Baumann H, eds. *Acute phase proteins. Molecular biology, biochemistry, and clinical applications*. Boca Raton: CRC Press, 3.
2. Isaac L, Florido M P, Fecchio D, Singer L M. 1999. Murine α_2 -macroglobulin increase during inflammatory responses and tumor growth. *Inflamm. Res.* 48: 446.
3. Bohe M, Genell S, Ohlsson K. 1986. Protease inhibitors in plasma and faecal extracts from patients with active inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 21: 598.
4. Lyoumi S, Puy H, Tamion F, Bogard C, Leplingard A, Scotte M, Vranckx R, Gauthier F, Hiron M, Daveau M, Nordmann Y, Deybach J C, Lebreton J P. 1999. Heme and acute inflammation role *in vivo* of heme in the hepatic expression of positive acute-phase reactants in rats. *Eur. J. Biochem.* 261: 190.
5. Bauer J, Weber W, Tran-Thi T A, Northoff G H, Decker K, Gerok W, Heinrich P C. 1985. Murine interleukin 1 stimulates α_2 -macroglobulin synthesis in rat hepatocyte primary cultures. *FEBS Lett.* 190: 271.
6. Brouckaert P G, Libert C. 1993. Tumor necrosis factor. In: Mackiewicz A, Kushner I, Baumann H, eds. *Acute phase proteins. Molecular biology, biochemistry, and clinical applications*. Boca Raton: CRC Press, 329.
7. Roberts R C. 1993. Rat α_2 -macroglobulin and related α_2 -macroglobulins in the acute phase response. In: Mackiewicz A, Kushner I, Baumann H, eds. *Acute phase proteins. Molecular biology, biochemistry, and clinical applications*. Boca Raton: CRC Press, 223.
8. Borth W, Luger T A. 1989. Identification of α_2 -macroglobulin as a cytokine binding plasma protein. Binding of interleukin-1 β to "F" alpha 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 264: 5818.
9. Matsuda T, Hirano T, Nagasawa S, Kishimoto T. 1989. Identification of α_2 -macroglobulin as a carrier protein for IL-6. *J. Immunol.* 142: 148.

10. Dennis P A, Saksela O, Harpel P, Rifkin D B. 1989. α_2 -macroglobulin is a binding protein for basic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* 264: 7210.
11. LaMarre J, Wollenberg G K, Gaudie J, Hayes M A. 1990. α_2 -macroglobulin and serum preferentially counteract the mitoinhibitory effect of transforming growth factor- α_2 in rat hepatocytes. *Lab. Invest.* 62: 545.
12. Ronne H, Anundi H, Rask L, Peterson P A. 1979. Nerve growth factor binds to serum α_2 -macroglobulin. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 87: 330.
13. Huang J S, Huang S S, Deuel T F. 1984. Specific covalent binding of platelet-derived growth factor to human plasma α_2 -macroglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 342.
14. James K. 1990. Interactions between cytokines and α_2 -macroglobulin. (Review) *Immunol. Today* 11: 163.
15. LaMarre J, Wollenberg G K, Gonias S L, Hayes M A. 1991. Cytokine binding and clearance properties of proteinase-activated α_2 -macroglobulins. (Review) *Lab. Invest.* 65: 3.
16. van Gool J, Boers W, de Nie I. 1978. Inhibitory effects of rat α_2 -macrofetoprotein (α_2 -MFP), an acute phase globulin, on galactosamine hepatitis. *Expl. Mol. Pathol.* 29: 228.
17. Sevaljevic L, Petrovic M, Bogojevic D. 1994. Pretreatment with α_2 -macroglobulin leads to recovery of rats exposed to a lethal scald. *Burns* 20: 122.
18. Ufkes J G, Ottenhof M, Labruyère W T, Boers W, van Vugt H, van Gool J. 1986. The effects of α_2 -fetoprotein, an acute phase protein, and BaSO₄-induced injury on IgE-mediated, systemic anaphylaxis in the rat. *Br. J. Exp. Path.* 67: 321.
19. van Gool J, Ladiges N C, de Nie I, Boers W. 1977. Inflammation inhibiting properties of rat α_2 -fetoprotein (rat α_2 -macroglobulin), an acute phase reactant. *Agents Actions* 2: S149.
20. van Gool J, Ladiges N C, Boers W. 1982. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis by α -macrofetoprotein, an acute-phase reactant of the rat. *Inflammation* 6: 127.
21. Pritchett T J, Paulson J C. 1989. Basis for the potent inhibition of influenza virus infection by equine and guinea pig α_2 -macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 264: 9850.
22. Umans L, Serneels L, Overbergh L, Lorent K, van Leuven F, van den Bergh H. 1995. Targeted inactivation of the mouse α_2 -macroglobulin gene. *J. Biol. Chem.* 270: 19778.
23. Brouckaert P G, Leroux-Roels G G, Guisez Y, Tavernier J, Fiers W. 1986. *In vivo* anti-tumour activity of recombinant human and murine TNF, alone and in combination with murine IFN- γ , on a syngeneic murine melanoma. *Int. J. Cancer* 38: 763.
24. Fransen, L, Van der Heyden J, Ruyschaert, R, Fiers W. 1986. Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon- γ on a variety of normal and transformed human cell lines. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 22: 419.
25. Takahashi N, Brouckaert P, Fiers W. 1991. Induction of tolerance allows separation of lethal and antitumor activities of tumor necrosis factor in mice. *Cancer Res.* 51: 2366.
26. Fiers W. 1995. Biologic therapy with TNF: Preclinical studies. In: deVita V T Jr, Hellman S, Rosenberg S A, eds. *Biologic therapy of cancer*. Philadelphia: J.B. Lippincott, 295.
27. Thom A K, Alexander H R, Andrich M P, Barker W C, Rosenberg S A, Fraker D L. 1995. Cytokine levels and systemic toxicity in patients undergoing isolated limb perfusion with high-dose tumor necrosis factor, interferon- γ , and melphalan. *J. Clin. Oncol.* 13: 264.
28. Vassalli P. 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. (Review) *Annu. Rev. Immunol.* 10: 411.
29. Libert C, Van Molle W, Brouckaert P, Fiers W. 1996. α_1 -antitrypsin inhibits the lethal response to TNF in mice. *J. Immunol.* 157: 5126.
30. Wielockx B, Bussolino F, Shapiro S D, Libert C. Involvement of a serine protease, but not of neutrophil elastase, in TNF-induced lethal hepatitis and induction of platelet-activating factor. Submitted.
31. Libert C, van Bladel S, Brouckaert P, Shaw A, Fiers W. 1991. Involvement of the liver, but not of IL-6, in IL-1-induced desensitization to the lethal effects of tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 146: 2625.
32. Espevik T, Nissen-Meyer J. 1986. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J. Immunol. Methods* 95: 99.
33. Kettelhut I C, Fiers W, Goldberg A L. 1987. The toxic effects of tumor necrosis factor *in vivo* and their prevention by cyclooxygenase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4273.
34. Beutler B, Milsark I W, Cerami A C. 1985. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. (Review) *Science* 229: 869.
35. Beutler B, Krays V. 1995. Lipopolysaccharide signal transduction, regulation of tumor necrosis factor biosynthesis, and signaling by tumor necrosis factor itself. (Review) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 25: S1.
36. Donnelly P B. 1965. Bacteraemic shock due to gram-negative bacilli. *Lancet* 10: 822.
37. Galanos C, Freudenberg M A. 1993. Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity. (Review) *Immunobiology* 187: 346.
38. Stone R. 1994. Search for sepsis drugs goes on despite past failures. *Science* 264: 365.
39. Abraham E, Marshall J C. 1999. Sepsis and mediator-directed therapy: rethinking the target populations. Mediator-directed therapy in sepsis: rethinking the target populations. *Mol. Med. Today* 5: 56.
40. Beutler B, Cerami A. 1988. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. (Review) *Annu. Rev. Biochem.* 57: 505.
41. Marino M W, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, Jungbluth A, Wada H, Moore M, Williamson B, Basu S, Old L J. 1997. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8093.
42. Peschon J J, Torrance D S, Stocking K L, Glaccum M B, Otten C, Willis C R, Charrier K, Morrissey P J, Ware C B, Mohler K M. 1998. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J. Immunol.* 160: 943.
43. Anakarahanonta T, Shinozuka H, Farber E. 1973. Inhibition of protein synthesis in rat liver by D-galactosamine. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 5: 481.
44. Nagaki M, Sugiyama A, Osawa Y, Naiki T, Nakashima S, Nozawa Y, Moriwaki H. 1999. Lethal hepatic apoptosis mediated by tumor necrosis factor receptor, unlike Fas-mediated apoptosis, requires hepatocyte sensitization in mice. *J. Hepatol.* 31: 997.
45. Tracey K J, Wei H, Manogue K R, Fong Y, Hesse D G, Nguyen H T, Kuo G C, Beutler B, Cotran R S, Cerami A, Lowry S F. 1988. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J. Exp. Med.* 167: 1211.
46. Libert C, Brouckaert P, Fiers W. 1994. Protection by α_1 -acid glycoprotein against tumor necrosis factor-induced lethality. *J. Exp. Med.* 180: 1571.
47. Hochepped T, van Molle W, Berger F G, Baumann H, Libert C. 2000. Involvement of the acute phase protein α_1 -acid glycoprotein in nonspecific resistance to a lethal gram-negative infection. *J. Biol. Chem.* 275: 14903.
48. Carell R W. 1990. The molecular structure and pathology of α_1 -antitrypsin. *Lung* 168: S530.
49. Blacker D, Wilcox M A, Laird N M, Rodes L, Horvath S M, Go R C, Perry R, Watson B Jr, Bassett S S, McInnis M G, Albert M S, Hyman B T, Tanzi R E. 1998. α_2 -macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat. Genet.* 19: 357.

IV.2.2. 'Mice lacking α_2 -macroglobulin show increased host defence against Gram-negative bacterial sepsis, but are more susceptible to endotoxic shock'

Tino Hochepeid¹, Fred Van Leuven², Peter Brouckaert¹ and Claude Libert^{1**}

Submitted for publication to Infection and Immunity

¹Department of Molecular Biology, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology and University Ghent, Ghent, Belgium; ²Department of Human Genetics, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology and Katholic University Leuven, Leuven, Belgium

The onset of an acute phase response is one of the initial steps in the defense against an infectuous organism. α_2 -Macroglobulin (α_2 M), an acute phase protein in most mammalian species, is known to have a broad antiprotease activity, but it can also bind a number of growth factors, cytokines, ions and lipid factors. We have shown that α_2 M deficient mice ($MAM^{-/-}$) are more resistant to a lethal Gram-negative infection, compared to control mice. This increased resistance was reflected in significantly higher body temperatures and lower IL-6 levels, compared to control mice, during the course of the infection and in the prolonged and increased survival. Moreover, clearance of the bacteria in $MAM^{-/-}$ mice was significantly more efficient than in control mice. On the other hand, $MAM^{-/-}$ mice were more susceptible to endotoxin. An LD₁₀₀-challenge with endotoxin in $MAM^{-/-}$ mice was not lethal for control mice. Our data suggest that α_2 M plays a dual role during an acute phase response. In the establishment of a lethal gram negative infection, leading to sepsis and septic shock, it has a mediating role, by hampering an efficient clearance of the bacteria. During endotoxic shock, however, α_2 M rather has a protective function.

Introduction

Septic shock is the most common cause of mortality in the intensive care unit. Bacterial infections are the most common cause of septic shock (1). Almost any bacterium can cause a septic shock, but *E. coli* and *K. pneumoniae*, are among the most frequent culture isolates (2). Unfortunately, the emergence of multi-drug-resistant bacteria has made the treatment of these patients quite problematic (3). Septic shock is the result of a very complex sequence of events, which is far from completely understood. It is characterized by an overwhelming inflammatory response to the infectuous microorganism itself or a component of its cell wall, endotoxin. This is due to pro-inflammatory cytokines such as

TNF and IL-1, which initiate a cascade of inflammatory cytokines, leading to the hemodynamic changes and inflammatory events that typify sepsis (4, 5). However, therapies with anti-TNF antibody or IL-1 receptor antagonist have not proven to be helpful (6), firstly because any given cytokine or mediator is only part of the puzzle and secondly because by the time patients reach medical attention, the cascade is in full motion, and neutralizing an early mediator may be of marginal benefit. Clearly, new and other approaches have to be followed. Therefore, host immune defence plays an ever increasing role in the eventual outcome of bacterial invasion. One possibility is to identify the contribution of endogenous molecules in the defence against an infection and to evaluate their therapeutic use. One of the first events

following an infection is the acute phase response (7). It is generally believed that acute phase changes play a major role in adaptation and defence. Acute phase changes include, amongst others, neuroendocrine and hematological changes, metabolic processes, changes in nonprotein plasma components, but the most pronounced hallmark of the acute phase response is the change in concentration of a large number of plasma proteins, the acute phase proteins (8). α_2 -Macroglobulin (α_2 M) is one of these acute phase proteins (9, 10). It is a high molecular weight glycoprotein (720 kDa) consisting of four identical subunits. It inhibits proteinases from all four major classes (11). Proteinase binding by α_2 M occurs by a 'trap' mechanism in which proteolytic cleavage of the bait region results in a conformational change of the α_2 M tetramer, thereby trapping the proteinase. The α_2 M-proteinase complexes are then rapidly cleared from the circulation by high-affinity receptors on various cell types (12). Besides proteinases, α_2 M also binds a number of cytokines and growth factors, such as TNF (13), IL-1 β (14), IL-6 (15), IL-10 (16), NGF (17), PDGF (18), TGF β (19) and mitogens, such as LPS (20). By binding to its signalling receptor, α_2 M can induce the release of platelet activating factor (21). Several groups have described anti-inflammatory effects of α_2 M, for example in D-(+)-galactosamine-induced hepatitis (22), in burn trauma (23), anaphylactic shock (24) and in inflammation caused by histamin, bradykinin or prostaglandins (25). Furthermore α_2 M inhibits PMN chemotaxis (26), influenza virus (27) and *T. cruzi* infection (28). Mouse α_2 M (MAM) has been knocked out in mice, without gross effects on viability (29), which was somewhat surprising since no deficiency of α_2 M in humans is known, suggesting a vital function (30). We were interested in the function of α_2 M during bacterial and endotoxic induced shock.

Materials and methods

Mice: C57BL/6 mice were purchased at Harlan (Harlan Olac, Blackthorn, UK) and

were further bred in our animal facility. α_2 M-deficient mice (MAM^{-/-}) were generated by gene targeting in ES cells. Mutant mice were backcrossed 7 generations in C57BL/6 using C57BL/6 mice from Harlan. After backcrossing, the mice (which were >99 % C57BL/6) were intercrossed and homozygous knockouts were further bred as brother-sister couples. All mice were kept in a conventional mouse room in 12h light/dark cycles and received food and water *ad libitum*. Female mice were used at the age of 8 weeks. At that age all mice had comparable body weight.

Infection model: *K. pneumoniae* (ATCC 43816), a strain which produces a lethal sepsis in normal mice (31-32) was inoculated intraperitoneally (0.5 ml). Survival was scored over a period of at least 10 days.

Injections: LPS from *Salmonella abortus equi* (Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)) was diluted in pyrogen-free PBS prior to injection and was given ip. in a volume of 0.5 ml.

Clearance of bacteria: 34h after an ip. injection of *K. pneumoniae*, mice were anesthetized using of tribromoethanol. Blood was taken by heart puncture. For preparation of plasma, 450 μ l blood was added to 50 μ l of sodium citrate (0.1 M). Immediately thereafter, mice were killed by cervical dislocation. Then, mice were perfused with 10 ml of a 0.9% NaCl solution to wash out the blood. The liver, spleen and kidney were removed aseptically, weighed and homogenized mechanically in sterile saline. For homogenization, the liver was diluted (w/v) 2-fold; spleen and kidney were diluted 10-fold. The suspensions were diluted and plated out on sterile nutrient agar. After overnight incubation at 37°C, CFU numbers were counted.

Blood collections and measurement of body temperatures: 100 μ l blood was withdrawn at the orbital plexus under light ether anesthesia. Rectal body temperatures were measured with an electronic thermometer (model 2001; Comark Electronics, Littlehampton, UK).

Measurement of IL-6: IL-6 was determined as described previously (33). IL-6-dependent 7TD1 cells were cultured in 96-well microtiter plates (7000 cells/well) in the

presence of medium, serial dilutions of serum, or a murine IL-6 standard. After 3 days of culture, the number of living cells was determined in a hexosaminidase colorimetric assay; titers were assigned by comparing the dilutions of samples and standard needed to obtain half-maximal growth of 7TD1 cells.

Statistical analysis: Survival was scored and evaluated using a Logrank test. Final lethality was scored using a χ^2 test. The statistical significance of the body temperatures, IL-6 levels and the number of bacterial colonies in the blood and the organs was determined using a Dunnett Anova test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. *, ** and *** represent $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

Results

Protection of MAM^{-/-} mice against a lethal bacterial challenge. To test the effect of a lethal Gram-negative infection in the MAM^{-/-} mice, compared to control mice, several concentrations of *K. pneumoniae* were injected intraperitoneally. When a dose of 10^4 CFU *K. pneumoniae* was injected, no difference in survival between control and MAM^{-/-} mice was observed (fig. 1A). With a dose of 10^2 CFU however, MAM^{-/-} mice lived significantly ($p=0.0038$) longer than the control mice (fig. 1B). Mice were observed for 10 days, after which no further deaths occurred.

Measurement of temperatures and cytokines. During the challenge, body temperatures and serum IL-6 levels of the mice were measured. 32 h as well as 56 h after the challenge with 10^4 CFU *K. pneumoniae*, MAM^{-/-} mice had a significantly higher temperature, compared to the control mice ($p=0.027$ and $p=0.0072$ respectively). When a dose of 10^2 CFU *K. pneumoniae* was used, MAM^{-/-} also had a significantly higher temperature than the control mice, 32 h after the challenge ($p=0.0273$) (table I). IL-6 levels in the serum of MAM^{-/-} mice also were significantly lower ($p=0.0017$) compared to the control mice, measured 34 h after a challenge with 10^4 CFU *K. pneumoniae* (table I).

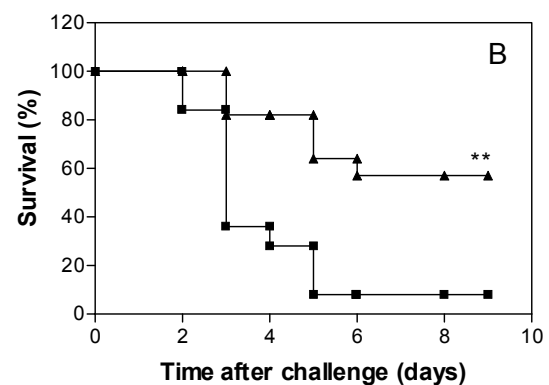
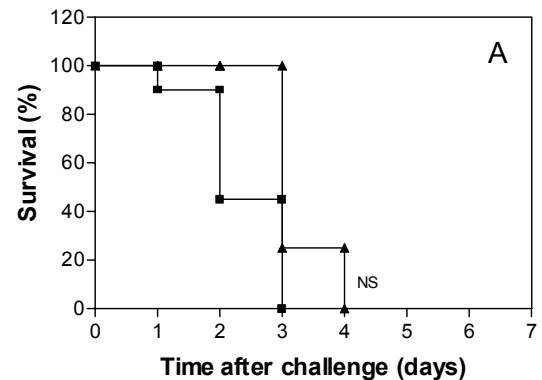


Figure 1: (A) Lethal effect of a dose of 10^4 CFU *K. pneumoniae*, given ip. in MAM^{-/-} (▲; n = 8) and in control mice (■; n = 20). (B) Lethal effect of a dose of 10^2 CFU *K. pneumoniae* in MAM^{-/-} (▲; n = 11) and in control mice (■; n = 13). NS, not significant; **, $p < 0.01$.

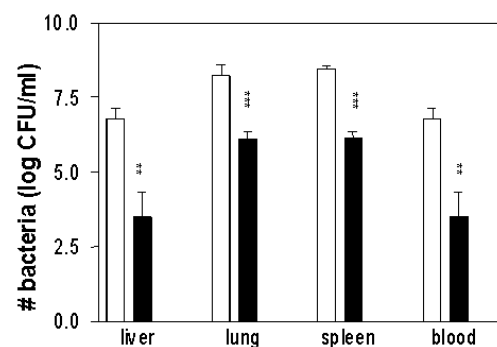


Figure 2: Counts of colonies of *K. pneumoniae* in the liver, lung, spleen and in the blood 34 h after a challenge with 10^2 CFU *K. pneumoniae*. Each bar represents the mean \pm S.D. of log CFU/ml of homogenized tissue from three mice (open bars = control mice; black bars = MAM^{-/-} mice). **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Challenge ^a	Genotype	Temperature (°C) ^b		IL-6 (pg/ml)
		Δ 32 h	Δ 56 h	Δ 34 h
10 ⁴ CFU	wt	35.7 \pm 1.8 (n = 10)	27.5 \pm 4.1 (n = 3)	4860 \pm 918 (n = 9)
	MAM ^{-/-}	37.4 \pm 0.3 (n = 7)*	36.4 \pm 0.8 (n = 4)**	2327 \pm 80 (n = 3)**
10 ² CFU	wt	34.9 \pm 3.9 (n = 13)	ND	ND
	MAM ^{-/-}	37.8 \pm 0.5 (n = 11)*	ND	ND

Table I: Temperatures measured 32h and 56h after infection with 10⁴ CFU *K. pneumoniae* and 32h after infection with 10² CFU in MAM^{-/-} and wt controls. IL-6 levels measured 34h after the infection with 10⁴ CFU *K. pneumoniae*. Mean temperatures or IL-6 levels and standard deviation are represented. The number of mice measured is indicated between brackets.

^a *K. pneumoniae* given intraperitoneally

^b *, p < 0.05; **, p < 0.01. Statistical significance compared to the values of the wt mice on the same time point.

Clearance of *K. pneumoniae* in blood and in different organs. In order to shed a light on the mechanism of protection against a lethal challenge with *K. pneumoniae*, we studied the number of bacteria in different organs and in the blood. 34 h after a challenge with 10² CFU *K. pneumoniae*, MAM^{-/-} mice showed significantly less bacteria in the lung, spleen (p < 0.01), liver and blood (p < 0.05), compared to control mice (fig. 2). These data suggest that the mechanism of protection is probably due to a faster clearance of the bacteria in the MAM^{-/-} mice.

Sensitization of MAM^{-/-} mice to endotoxin challenge. To test if α_2 M also plays a mediating role in LPS-mediated sepsis, MAM^{-/-} mice were injected with different doses of endotoxin in order to determine the LD₁₀₀ (data not shown). In a second experiment, MAM^{-/-} mice and control mice were injected with 100 μ g of endotoxin (= LD₁₀₀ for MAM^{-/-} mice) and survival was scored (fig. 3). The results of these experiments show that MAM^{-/-} mice are more susceptible to endotoxic shock, compared to control mice.

Discussion

Septic shock is the culmination of a series of events initiated by the presence of microorganisms (and their proteins or lipid products) in the circulation and is mediated by the host's own immune system (1); shock

is the result of the combined action of several pro-inflammatory cytokines induced in macrophages and other cells (5). Septic shock and sepsis, leading to cardiovascular depression and multiple organ failure, are causing more than 100.000 casualties per year in the United States (34). Unfortunately, the emergence of multi-drug-resistant bacteria has made the treatment of these patients quite problematic (3). Moreover, therapies with anti-TNF antibody or IL-1 receptor antagonist have not proven to be helpful (6). Clearly new and other approaches are needed and therefore it is necessary to understand the function of the different aspects of the host's defence system against a challenge with living bacteria and/or their immune stimulating cell wall components. One of the first reactions

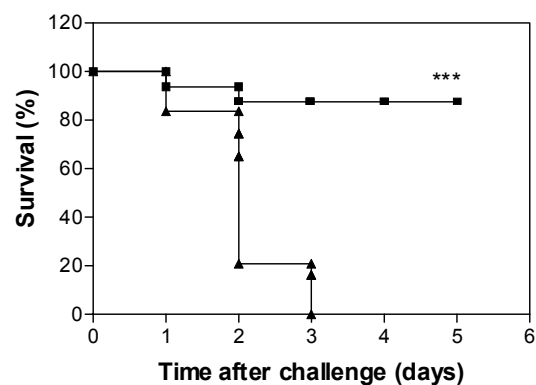


Figure 3: Survival following ip. challenge with 100 μ g of endotoxin in MAM^{-/-} (▲; n = 43) and in control mice (■; n = 16). ***, p < 0.0001.

following an infection is the onset of an acute phase response. The main characteristic of an acute phase response is the change in concentration of a large number of plasma proteins, the acute phase proteins (7). It is widely held that components of the acute phase response influence the inflammatory response or enhance adaptation to noxious stimuli. Although this probably is true most of the time, it is not invariably true. The host response may be either protective or destructive; an example of the latter is septic shock (8). α_2 M is an acute phase reactant in most mammalian species (not in humans) (10, 12). It is a high molecular weight glycoprotein (720 kDa) consisting of four identical subunits, and it is able to inhibit proteinases from all four major classes by using a so-called 'trap mechanism' (11). The trapped proteinase is removed from the circulation by high affinity receptor binding of the complex (12). α_2 M is also able to bind a number of cytokines and growth factors. The binding to α_2 M does not necessarily lead to reduced activity of the cytokine or growth factor, but it may have effects on the pharmacokinetics and bioavailability of the hormones (30). Several groups have described anti-inflammatory effects of α_2 M *in vivo* (22-28). α_2 M has been knocked out in mice, without gross effects on viability (29).

In the present study, we have investigated the possible function of α_2 M during septic shock, induced by *K. pneumoniae* (31-32), and in LPS-induced shock, using MAM^{-/-} mice. This work is an extension of previous research on the role of acute phase proteins in TNF-induced and septic shock (35, 36, 37). We found that MAM^{-/-} mice did not significantly live longer when given a high dose of bacteria (10^4 CFU) intraperitoneally, although MAM^{-/-} mice had higher temperatures and lower IL-6 levels after the bacterial infection. Survival of the MAM^{-/-} mice was 54.5 %, compared to 7.6 % for the control mice, when a lower dose of bacteria (10^2 CFU) was used. Protection of the MAM^{-/-} mice was also reflected in significantly higher body temperatures 32h after the infection. To clarify the mechanism of protection, we studied the clearance of

the bacteria in the blood and in different organs. We found that the number of bacteria in the blood, liver, kidney, and spleen, 34 hours after infection with a lethal dose of *K. pneumoniae* was significantly lower in MAM^{-/-} mice compared to control mice. Given the observation of early bacteremia in animals infected with *K. pneumoniae*, it is postulated that the mice are dying due to dissemination of the invading organism and associated sepsis (31). Therefore, the survival benefits conferred by the absence of α_2 M may be a result of enhanced initial clearance of *K. pneumoniae*, as evidenced by the significant reduction in the CFU noted in blood and in liver, kidney and lung homogenates. This initial clearance of bacteria likely leads to more effective containment of the infection and, as a result, an improved outcome. The absence of α_2 M can contribute to an enhanced clearance of the bacteria in different ways. Firstly, the enhanced clearance of the bacteria can be the result of an enhanced neutrophil recruitment. It has already been demonstrated that, as well *in vitro* as *in vivo*, α_2 M shows strong PMN-chemotaxis-inhibiting properties (38, 20). Since α_2 M is not the only acute phase protein inhibiting the chemotactic response - α_1 -AGP also inhibits the chemotactic response of PMN (39, 40), we cannot ascribe the enhanced clearance of the bacteria in the MAM^{-/-} mice only to the PMN-inhibiting property of α_2 M. Clearly other mechanisms are also involved. Secondly, binding of receptor recognized forms of α_2 M to macrophage α_2 M signalling receptor induces synthesis of platelet activating factor, a well-known mediator of endotoxic shock in rodents (21). Thirdly, α_2 M is also known to bind and inhibit a number of proteases. Neutrophil elastase (NE), one of the proteases known to bind to α_2 M (20), has been shown to play an important role in the defence against a Gram-negative infection. It was shown that NE^{-/-} mice were more susceptible than their normal littermates to sepsis and death following intraperitoneal infection with *K. pneumoniae*. It was further shown that NE is directly cytotoxic to *K. pneumoniae* (31). TNF has been shown to be an essential cytokine

mediator of bacterial clearance (41). α_2 M has been shown to suppress the secretion of TNF by human peripheral blood mononuclear cells in a concentration dependent manner (42). Since α_2 M concentration rises during the acute phase response, provoked by the bacterial challenge, it is possible that less TNF can be released from mononuclear cells than needed, to provide a sufficient clearance of the bacteria. Finally, since α_2 M binds a wide variety of molecules, we cannot exclude other possible mechanisms contributing to the clearance of bacteria being affected by the absence of α_2 M.

In contrast to its potentially mediating role during Gram-negative infection, we showed that α_2 M plays a rather protective role during endotoxic shock, since MAM^{-/-} mice were more susceptible to endotoxin challenge than control mice. In line with these results, Van Vugt *et al.* reported that α_2 M could protect against endotoxic shock, possibly by binding to PGE₂, a vasodilating agent, thereby reducing vascular permeability (43). Umans *et al.*, who generated the MAM^{-/-} mice, showed that they were less susceptible to endotoxin challenge than control mice. However, they challenged the mice in the footpads (29). It must also be noted that the type of LPS used in our experiments (derived from *Salmonella abortus equi*) was from a different strain than the LPS they used (from *Escherichia coli*). Another remark concerning the opposite results is that their initial experiments were done in mice that had a mixed genetic background, since they were not backcrossed yet. For our experiments, we used MAM^{-/-} mice that had been backcrossed seven generations into a C57BL/6 background. Since it has been shown that α_2 M can bind LPS, this opposite effect could possibly be due to a differential binding of α_2 M to different types of LPS.

In conclusion, we have demonstrated that MAM^{-/-} mice are resistant to a lethal Gram-negative infection. The MAM^{-/-} mice had significantly higher temperatures and lower IL-6 levels during the course of the infection and lived significantly longer compared to control mice. Moreover, MAM^{-/-} mice had significantly less bacteria in the blood and in

different organs, suggesting a more efficient clearing mechanism in the absence of α_2 M. We think that the capacity of α_2 M to bind and inhibit a number of molecules that can contribute to an efficient defence against the bacterial challenge might be a reasonable explanation for the protection. MAM^{-/-} mice were however more susceptible to endotoxin challenge, possibly by lack of binding of PGE₂ by α_2 M in the course of endotoxic shock, resulting in an increased vascular permeability, compared to control animals.

References

1. Donnelly, P. B. 1965. Bacteraemic shock due to gram-negative bacilli. *Lancet* 10, 822-823
2. Turck, M. 1977. in *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Thorn, G. W., Adams, R. D., Braunwald, E., Isselbacher, K. J., and Petersdorf, R. G., eds) pp. 830-835, McGraw-Hill Kogakusha, Tokyo
3. Davies, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264, 375-382
4. Remick, D., Strieter, R., Eskandari, M., Nguyen, D. T., Genord, K. A., Raiford, C. L., and Kunkel, S. L. 1990. Role of tumor necrosis factor- α in lipopolysaccharide induced pathologic alterations. *Am. J. Pathol.* 136, 49-60
5. Galanos, C., and Freudenberg, M. A. 1993. Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity. *Immunobiology* 187, 346-356
6. Abraham, E. and Marshall, J. C. 1999. *Mol. Med. Today* 5, 56-58
7. Kushner, I. 1982. The phenomenon of the acute phase response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 389, 39-48
8. Kushner, I. And Rzewnicki, D. 1999. in *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, 3rd ed. (Gallin, J. I. And

Snyderman, R., eds) pp. 317-329, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

9. Kushner, I., and Mackiewicz, A. 1993 in Acute Phase Proteins. Molecular Biology, Biochemistry, and Clinical Applications (Mackiewicz, A., Kushner, I. and Baumann, H., eds) pp. 3-19, CRC Press, Boca Raton

10. Isaac, L., Florido, M. P., Fecchio, D., and Singer, L. M. 1999. Murine alpha-2-macroglobulin increase during inflammatory responses and tumor growth. *Inflamm. Res.* 48, 446-452.

11. Horn, F., Wegenka, U. M., and Heinrich, P. C. 1993. in Acute Phase Proteins. Molecular Biology, Biochemistry, and Clinical Applications (Mackiewicz, A., Kushner, I. and Baumann, H., eds) pp. 443-465, CRC Press, Boca Raton

12. Roberts, R. C. 1993 in Acute Phase Proteins. Molecular Biology, Biochemistry, and Clinical Applications (Mackiewicz, A., Kushner, I. and Baumann, H., eds) pp. 223-238, CRC Press, Boca Raton

13. Wollenberg, G. K., LaMarre, J. Rosendal, S., Gonias, S. L., and Hayes, M. A. 1991. Binding of tumor necrosis factor alpha to activated forms of human plasma alpha₂ macroglobulin. *Am. J. Pathol.* 138, 265-272

14. Borth, W., and Luger, T. A. 1989. Identification of α_2 -macroglobulin as a cytokine binding plasma protein. *J. Biol. Chem.* 264, 5818-5825.

15. Matsuda, T., Hirano, T., Nagasawa, S., and Kishimoto, T. 1989. Identification of α_2 -macroglobulin as a carrier protein for IL-6. *J. Immunol.* 142, 148-152.

16. Garber, T. R., Gonias, S. L. and Webb, D. J. 2000. Interleukin-4 and IL-10 bind covalently to activated human alpha₂-macroglobulin by a mechanism that requires Cys949. *J. Interferon Cytokine Res.* 20, 125-131

17. Ronne, H., Anundi, H., Rask, L., and Peterson, P.A. 1979. Nerve growth factor binds to serum alpha-2-macroglobulin. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 87, 330-336.

18. Huang, J.S., Huang, S.S., Deuel, T.F.. 1984. Specific covalent binding of platelet-derived growth factor to human plasma alpha₂-macroglobulin. : *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 342-346.

19. Gonias, S. L., Carmichael, A., Mettenburg, J. M., Roadcap, D. W., Irvin, W. P., and Webb, D. J. 2000. Identical or overlapping sequences in the primary structure of human alpha(2)-macroglobulin are responsible for the binding of nerve growth factor-beta, platelet-derived growth factor-BB, and transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.*, 275, 5826-5831.

20. James, K. 1980. Alpha₂ macroglobulin and its possible importance in immune systems. *Trends Biochem. Sci.* 5, 143-149

21. Misra, U. K., and Pizzo, S. V. 1996. Ligation of the alpha₂-macroglobulin signaling receptor on macrophages induces synthesis of platelet activating factor. *J. Cell. Biochem.* 61, 39-47

22. Van Gool, J., Boers, W., and De Nie, I. 1978. Inhibitory effects of rat α_2 -macrofetoprotein (α_2 FP), an acute phase globulin, on galactosamine hepatitis. *Exp. Mol. Pathol.* 29, 228-240.

23. Sevaljevic, L., Petrovic, M., Bogojevic, D. 1994. Pretreatment with alpha₂-macroglobulin leads to recovery of rats exposed to a lethal scald. *Burns* 20, 122-127.

24. Ufkes, J. G. R., Ottenhof, M., Labruyère, W. T., Boers, W., van Vugt, H., and van Gool, J. 1986. The effects of α_M -foetoprotein, an acute phase protein, and BaSO₄-induced injury on IgE-mediated, systemic anaphylaxis in the rat. *Br. J. Exp. Path.* 67, 321-327.

25. Van Gool, J., Ladiges, N. C. J. J., De Nie, I., and Boers, W. 1977. Inflammation

inhibiting properties of rat α_M fetoprotein (rat α_2 -macroglobulin), an acute phase reactant. *Agents Actions* 2, S149

26. Van Gool, J., Ladiges, N. C. J. J., and Boers, W. 1982. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis by α -macrofetoprotein, an acute-phase reactant of the rat. *Inflammation* 6, 127-135.

27. Pritchett, T. J., and Paulson, J. C. 1989. Basis for the potent inhibition of influenza virus infection by equine and guinea pig α_2 -macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 264, 9850-9856.

28. Araujo-Jorge, T. C., Lage, M. J., Rivera, M. T., Carlier, Y., and Van Leuven, F. 1992. *Trypanosoma cruzi*: enhanced alpha-macroglobulin levels correlate with the resistance of BALB/cj mice to acute infection. *Parasitol. Res.* 78, 215-221

29. Umans, L., Serneels, L., Overbergh, L., Lorent, K., Van Leuven, F., and Van den Berghe, H. 1995. Targeted inactivation of the mouse α_2 -macroglobulin gene. *J. Biol. Chem.* 270, 19778-19785.

30. James, K. 1990. Interactions between cytokines and α_2 -macroglobulin. *Immunol. Today.* 11:163-166.

31. Belaouaj, A., McCarthy, R., Baumann, M., Gao, Z., Ley, T. J., Abraham, S. N., and Shapiro, S. D. 1998. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nature Medicine* 4, 615-618

32. Van der Meer, J. W. M. 1988. The effects of recombinant interleukin-1 and recombinant tumor necrosis factor on non-specific resistance to infection. *Biotherapy* 1, 19-25

33. Van Snick, J., Cayphas, S., Vink, A., Uyttenhove, C., Coulie, P. G., Rubira, M. R., and Simpson, R. J. 1986. Purification and NH2-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 9679-9683

34. Stone, R. 1994. Search for sepsis drugs goes on despite past failures. *Science* 264, 365-367

35. Libert, C., Brouckaert, P., and Fiers, W. 1994. Protection by alpha₁-acid glycoprotein against tumor necrosis factor-induced lethality. *J. Exp. Med.*, 180, 1571-1575

36. Hochepped, T., Van Molle, W., Berger, F. G., Baumann, H., and Libert, C. 2000. Involvement of the acute phase protein α_1 -acid glycoprotein in nonspecific resistance to a lethal gram-negative infection. *J. Biol. Chem.*, 275, 14903-1490

37. Hochepped, T., Ameloot, P., Van Leuven, F. And Libert, C. 2000. Differential response of α_2 -macroglobulin-deficient mice in models of lethal TNF-induced inflammation. *Eur. Cytokine Netw.* 11, 597-601

38. Van Gool, J., Ladiges, N. C. J. J., and Boers, W. 1982. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis by α -macrofetoprotein, an acute-phase reactant of the rat. *Inflammation* 6, 127-135

39. Bennet, M., and Schmid, K. 1980. Immunosuppression by human plasma α_1 -acid glycoprotein: importance of the carbohydrate moiety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 6109-6113

40. Lainé, E., Couderc, R., Roch-Arveiller, M., Vasson, M. P., Giroud, J. P., and Raichvarg, D. 1990. Modulation of human polymorphonuclear neutrophil functions by α_1 -acid glycoprotein. *Inflammation* 14, 1-9

41. Standiford, T. J., Wilkowski, J. M., Sisson, T. H., Hattori, N., Mehrad, B., Bucknell, K. A., and Moore, T. A. 1999. Intrapulmonary tumor necrosis factor gene therapy increases bacterial clearance and survival in murine gram-negative pneumonia. *Hum. Gene Ther.* 10, 899-909

42. Scuderi, P., Dorr, R. T., Liddil, J. D., Finley, P. R., Meltzer, P., Raitano, A. B., and Rybski, J. 1989. Alpha-globulins

suppress human leukocyte tumor necrosis factor secretion. Eur. J. Immunol. 19, 939-942

43. Van Vugt, H., van Gool, J., and de Ridder, L. 1986. Alpha₂ macroglobulin of the rat, an acute phase protein, mitigates the early course of endotoxin shock. Br. J. Exp. Pathol. 67, 313-319

IV.3. BESPREKING

α_2 -Macroglobuline (α_2 M) is een breed spectrum protease inhibitor; het kan proteasen van de 4 klassen (serine-, cysteine, aspartaat-, en metalloproteasen) binden. Na binding van het protease door α_2 M is het actief centrum van het protease enkel nog toegankelijk voor relatief kleine substraten. Het α_2 M-protease complex wordt echter relatief vlug uit de circulatie verwijderd door binding op de α_2 M-receptor. Daarnaast kan α_2 M echter nog een groot aantal aan cytokines en groeifactoren binden. De activiteit van het cytokine/groeifactor wordt daarbij meestal niet geïnhibeerd, maar de binding met α_2 M kan wel gevolgen hebben voor de biobeschikbaarheid en distributie van het cytokine/groeifactor. Ook bepaalde mitogenen (o.a. LPS) en ionen (Zn^{2+} , Ni^{2+}) worden door α_2 M gebonden. Net als α_1 -AGP bevat α_2 M een aantal immunomodulerende activiteiten, vooral tegenover neutrofielen, en bezit het een aantal beschermende eigenschappen *in vivo*. Desondanks is de eigenlijke biologische functie van α_2 M niet duidelijk. Bij de mens is het geen AFP, maar aangezien het bij muizen, konijnen, ratten, e.a. wel een acute fase eiwit is, ligt het eerder voor de hand dat α_2 M vooral tijdens een inflammatoire toestand een belangrijke rol speelt.

Om iets meer te weten te komen over de biologische rol van α_2 M, werden door Umans *et al.* (1995) α_2 M deficiënte muizen ($MAM^{-/-}$) gemaakt. Tijdens een primaire karakterisatie werd duidelijk dat deze muizen in normale omstandigheden geen fenotype vertonen. Karakterisatie van de muizen in inflammatoire modellen leverde wel een fenotype op: $MAM^{-/-}$ muizen bleken gevoeliger in een model van acute pancreatitis en waren minder gevoelig voor een LD₅₀ dosis endotoxines van *E. coli*, geïnjecteerd in de voetzolen.

Wij hebben de $MAM^{-/-}$ muizen bestudeerd in een aantal inflammatoire modellen die leiden tot een shock syndroom (TNF-, LPS injectie en Gram-negatieve infectie met *K. pneumoniae*).

$MAM^{-/-}$ muizen bleken minder gevoelig aan TNF-geïnduceerde shock dan controle muizen. Nochthans werd eerder het omgekeerde verwacht, aangezien in de onderzoeksgroep aangetoond werd dat TNF-geïnduceerde letaliteit kan verhinderd worden door toediening van de serine protease inhibitor α_1 -antitrypsine (Libert *et al.*, 1996). De protectie in de $MAM^{-/-}$ muizen kon echter niet verklaard worden door een rechtstreeks effect van α_2 M via binding op TNF, aangezien de activiteit van TNF er niet door geïnhibeerd wordt (Wollenberg *et al.*, 1991). Bovendien was er geen meetbaar verschil tussen de daling in TNF bioactiviteit in het serum van $MAM^{-/-}$ en controle muizen, in functie van de tijd. TNF induceert echter de vrijstelling van een cascade aan cytokines en andere inflammatoire mediators. Het is mogelijk dat andere cytokines, die aan de basis liggen van de systemische inflammatie (bv. IL-1 (Borth *et al.*, 1989)) door α_2 M gebonden worden, waardoor deze langer in de circulatie blijven en hun pro-inflammatoir effect gedurende een langere tijd kunnen uitoefenen. Anderszijds kunnen anti-inflammatoire cytokines (TGF β , IL-4, IL-10 (Gonias *et al.*, 2000; Garber *et al.*, 2000)) gebonden en geïnactiveerd worden door α_2 M.

MAM^{-/-} muizen waren daarentegen niet langer beschermd (maar waren ook niet gevoeliger) tegen TNF wanneer ze gesensitiseerd werden met galactosamine (GalN), een hepatotoxine, dat specifiek transcriptie en translatie in de hepatocyten inhibeert. Co-injectie van TNF en GalN leidt tot een inflammatoire hepatitis, waarbij massale apoptose en necrose van de hepatocyten optreedt, resulterend in letaliteit. Ook in dit inflammatoir model spelen proteasen nochtans een belangrijke rol, aangezien zowel α_1 -AT, als BB94, een breed spectrum matrix metallo-protease inhibitor kunnen beschermen (Libert *et al.*, 1996; B. Wielockx, ongepubliceerde resultaten). IL-1 kan eveneens bescherming bieden tegen TNF/GalN, wanneer het 12h voor het TNF/GalN toegediend wordt. Dit wordt desensitisatie genoemd en is gemedieerd door een of meerdere factoren die door de lever geproduceerd worden (Libert *et al.*, 1991). Aangezien IL-1 nog steeds kan desensitiseren in de MAM^{-/-} muizen, is α_2 M niet een van deze factoren. Tolerisatie tenslotte beschermt de muizen tegen een letale TNF-injectie en wordt opgewekt door gedurende 5 dagen, 2x per dag, een niet toxische dosis TNF toe te dienen. Ook in dit beschermingsmechanisme is α_2 M niet betrokken, aangezien tolerisatie nog steeds optreedt in MAM^{-/-} muizen.

α_2 M-deficiëntie leidt ook tot bescherming tegen een letale dosis Gram-negatieve bacteriën. Ongeveer 60% MAM^{-/-} muizen overleven een LD₁₀₀ dosis *K. pneumoniae*. Ook bij een hogere dosis bacteriën is er een verschil te zien tussen MAM^{-/-} en wt muizen. Er is weliswaar geen verschil in de overleving, maar de lichaamstemperatuur 56h na de infectie was significant hoger en de serum IL-6 waarden 34h na de infectie waren significant lager bij de MAM^{-/-} muizen in vergelijking met controle muizen. Het effect van α_2 M blijkt zich, net zoals bij AGP, te situeren ter hoogte van de opruiming/verspreiding van de bacteriën. In dit geval is het echter de afwezigheid van α_2 M die een positief effect uitoefent. De afwezigheid van α_2 M kan op meerdere manieren bijdragen tot een efficiëntere bestrijding van de bacteriële infectie. (i) α_2 M bezit zowel *in vitro* als *in vivo* neutrofiel inhiberende activiteiten. Zo wordt zowel de chemotaxis als de fagocytose van bacteriën geïnhibeerd (Van Gool *et al.*, 1982). De afwezigheid van α_2 M kan dus zorgen voor een efficiëntere recrutering en activatie van neutrofielen. (ii) Binding van α_2 M op zijn signalisatiereceptor leidt tot de vrijstelling van PAF, dat een sterke vasodilaterende werking bezit en een belangrijke mediator is van shock. (iii) α_2 M is ook in staat om neutrofiel elastase (NE) te binden en te inactiveren. NE speelt een belangrijke rol tijdens de verdediging tegen een Gram-negatieve infectie en is zelfs rechtstreeks cytotoxisch voor *K. pneumoniae*. (iv) De vrijstelling van TNF, dat initieel een belangrijke rol speelt in de verdediging tegen infecties, kan eveneens geïnhibeerd worden door α_2 M. Aangezien de concentratie α_2 M stijgt tijdens een acute fase respons veroorzaakt door een bacteriële infectie bijvoorbeeld, is het mogelijk dat er niet voldoende TNF vrijgesteld wordt om de infectie initieel te bestrijden. (v) Tenslotte bindt α_2 M een grote verscheidenheid aan moleculen, waarvan mogelijks een aantal eveneens een rol spelen tijdens infectie. Nog

andere mechanismen die bijdragen tot de verwijdering van de bacteriën kunnen dus niet uitgesloten worden.

Tijdens endotoxine-geïnduceerde shock doet zich het tegenovergestelde fenomeen voor. 80% van de controle muizen overleeft een dosis endotoxines van *Salmonella abortus equi* die 100% letaal is voor de $MAM^{-/-}$ muizen. In overeenstemming met dit resultaat hebben van Vugt *et al.* (1986) aangetoond dat α_2M kon beschermen tegen LPS-geïnduceerde letaliteit, waarschijnlijk via binding van α_2M op PGE_2 , een sterk vasodilaterend agens, waardoor dit sneller uit de circulatie verwijderd werd. Dit zou een positief effect kunnen hebben op de vasculaire permeabiliteit. Aangezien $MAM^{-/-}$ muizen beschermd zijn tegen TNF-gemedieerde letaliteit en gevoeliger zijn voor LPS-gemedieerde letaliteit, lijkt een effect stroomopwaarts van de door LPS-gemedieerde inductie van TNF een logische verklaring voor deze differentiële effecten. Er werd inderdaad beschreven dat α_2M bindt op LPS (James, 1980). Dit zou kunnen leiden tot een snellere detoxificatie en eliminatie van het LPS uit de circulatie. Anderzijds verloopt de LPS-geïnduceerde toxiciteit niet noodzakelijk via TNF-inductie (Amiot *et al.*, 1997; Rothe *et al.*, 1993; Pfeiffer *et al.*, 1993) en is het dus mogelijk dat het effect van α_2M tijdens TNF- en LPS-geïnduceerde shock zich op een totaal ander niveau bevindt.

Umans *et al.* (1995), die de $MAM^{-/-}$ muizen gemaakt hebben, hebben echter tijdens de initiële fenotypering van de muizen vastgesteld dat $MAM^{-/-}$ muizen minder gevoelig waren aan een LD_{50} dosis endotoxines. Er zijn echter een aantal belangrijke verschillen te noteren tussen beide experimenten. Vooreerst is de route van injectie verschillend (Umans *et al.* injecteerden het LPS in de voetzolen). De route van injectie kan een belangrijke rol spelen in de activering van endogene beschermingsmechanismen. Afhankelijk van de route van toediening spelen NK cellen bijvoorbeeld al dan niet een beschermende rol tijdens een *C. neoformans* infectie (Lipscomb *et al.*, 1987). Het LPS dat gebruikt werd is afkomstig van *E. coli*, in tegenstelling tot het LPS van *S. abortus equi* dat hier gebruikt werd. Een differentiële binding van LPS afkomstig van verschillende bacterie soorten door α_2M kan al dan niet zorgen voor een snellere eliminatie ervan uit de circulatie, maar kan ook verschillende biologische activiteiten vertonen (LPS van *K. pneumoniae* is bijvoorbeeld 10 maal minder toxisch dan dat van *S. abortus equi*). Een derde belangrijk verschil is de genetische achtergrond van de muizen waarin de experimenten uitgevoerd werden. Tijdens de initiële fenotypering door Umans *et al.*, werd gebruik gemaakt van $MAM^{-/-}$ muizen die een gemengde genetische achtergrond 129/JXC57BL/6 hadden en dus nog niet teruggekruist waren. Hier werd gebruik gemaakt van $MAM^{-/-}$ muizen die al zeven generaties teruggekruist waren in een C57BL/6 genetische achtergrond.

HOOFDSTUK V – EERSTE FASE VAN DE ONTWIKKELING VAN α_1 -ZUUR GLYCOPROTEINE-DEFICIENTE MUIZEN

V.1. INLEIDING

Gen targeting technologie maakt gebruik van homologe recombinatie tussen chromosomale en geïntroduceerde DNA sekwenties in pluripotente muis embryonale stamcellen (ES) om verscheidene soorten mutaties te genereren. Dit gaat van het introduceren van subtiele mutaties tot deletie van volledige genen of zelfs stukken van een chromosoom. Er komen verschillende fasen aan te pas om een knockout muis te genereren. Vooreerst moet het desbetreffende gen gekloneerd en gekarakteriseerd worden. Ten tweede moet aan de hand van de bekomen restrictiemap en eventuele sekwentiegegevens een strategie uitgewerkt worden voor de constructie van een targeting vector en moet tegelijkertijd een procedure uitgewerkt worden voor de latere screening van de ES-cellen. Ten derde worden de ES-cellen geëlectroporeerd met de gelineariseerde targeting vector en worden de ES-cellen die de selectie overleefd hebben gescreend op het al dan niet bezitten van de gewenste mutatie. Tenslotte wordt de mutatie in de geslachtscellen van de muizen geïntroduceerd via de aanmaak van chimere muizen die de mutatie doorgeven aan hun nakomelingen. Deze en verschillende andere aspecten i.v.m. het creëren van knockout muizen staan uitgebreid beschreven in tal van overzichtsartikels (Müller, 1999; Kühn en Schwenk, 1997; Galli-Taliadoros *et al.*, 1995; Melton, 1994).

V.1.1. Embryonale stamcellen

De eerste embryonale stamcellen (ES-cellen) werden geïsoleerd uit muis blastocysten. Dit gebeurde door twee onderzoeksgroepen, onafhankelijk van elkaar (Martin, 1981; Evans en Kaufman, 1981). Bradley *et al.* (1984) hebben aangetoond dat ES-cellen in staat waren om bij te dragen tot de ontwikkeling van verscheidene weefsels, waaronder de voortplantingsorganen, wanneer ze in blastocysten geïnjecteerd werden en terug ingeplant in een draagmoeder. De eerste knockout muis werd beschreven in 1987 door Kuehn *et al.*, die met behulp van een retrovirale vector een afunctioneel *hprt* gen gecreëerd hadden. Sindsdien zijn al honderden knockouts gemaakt.

Er werden al ES-cellen afgeleid van verscheidene muis stammen. De meeste gebruikte ES-cellen zijn echter afkomstig van de 129 muis stam (R1, J1, D3, RW-4, e.a.).

V.1.2. Targeting construct

De mutatie wordt in de ES-cellen aangebracht via een vector. Dit kan een virale vector zijn, maar in 99% van de gevallen is het een bacteriële vector.

V.1.2.1. Types targeting vectoren

Een targeting vector is ontworpen om te recombineren met een specifieke chromosomale locus. De minimale vereisten voor dergelijke vector zijn sekwenties die homologoog zijn met de gewenste chromosomale integratie plaats en een plasmide 'backbone'. Er zijn voornamelijk twee soorten targeting vectoren te onderscheiden: de vervangingsvector en de integratievector.

Vervangingsvectoren worden het meest gebruikt. Ze worden gelineariseerd buiten de homologe sekwenties van de vector. Na introductie in ES-cellen zal een dubbele homologe recombinatie, tussen beide homologe DNA sekwenties, ervoor zorgen dat alles wat zich in de chromosomale locus tussen de homologe sekwenties bevindt, vervangen wordt door de sekwenties van de vector die zich binnen de homologe sekwenties op de vector bevinden. Heterologe sekwenties die zich buiten de homologe op de vector bevinden gaan verloren.

Integratievectoren daarentegen worden gelineariseerd binnen de homologe vectorsekwentie. Na introductie in de ES-cellen volstaat een enkele homologe recombinatie om de volledige vector te integreren in de doelsekwentie. Het gerecombineerd allel bezit dus een duplicatie van de doel-homologie, gescheiden door de heterologe sekwenties van de vector "backbone".

V.1.2.2. Selectiemerkers

Wanneer een targeting vector in de ES-cellen gebracht wordt, kan deze ofwel in de doel locus integreren via homologe recombinatie, ofwel in een willekeurige locatie via heterologe recombinatie, ofwel totaal niet integreren. De frekwentie van heterologe recombinatie is veel groter dan deze van homologe recombinatie. Om het aantal ES-cel kloons te reduceren die het targeting construct niet of via heterologe recombinatie opgenomen hebben, wordt gebruik gemaakt van selectiemerkers. De positieve selectiemerker (bv. het *neomycine fosfotransferase* resistentie (*Neo^r*) gen) dient om de ES-cellen te elimineren die de vector helemaal niet opgenomen hebben. Deze selectiemerker bevindt zich meestal binnen de homologe sekwenties in de vector. Een negatieve selectiemerker (bv. het *herpes simplex virus thymidine kinase* (*HSVtk*) gen) dient om ES-cellen die de vector via heterologe recombinatie opgenomen hebben te elimineren. Deze selectiemerker bevindt zich buiten de homologe sekwenties en zal in het geval van een vervangingsvector enkel in het gastheergenoom geïntroduceerd worden via heterologe recombinatie, waarbij de volledige vector geïntegreerd wordt. Door in het ES-cel medium te selecteren tegen de aanwezigheid van de negatieve selectiemerker en voor de aanwezigheid van de positieve selectiemerker worden in theorie enkel correct getargette ES-cel kloons overgehouden.

V.1.2.3. Homologe sekwenties

Bij de keuze van de homologe sekwenties spelen twee factoren een belangrijke rol: de lengte van de homologe sekwenties en de graad van homologie.

De vuistregel is dat hoe langer de homologe sekwenties zijn, hoe groter de targeting frekwentie. De ideale lengte van de homologe sekwenties bedraagt 5-10 kb. Daarboven kan de grootte van de vector een negatieve rol beginnen spelen. Er werd echter al homologe recombinatie bekomen met een totale homologie van 1.9 kb. (Hasty *et al.*, 1991). Bij de meeste targeting vectoren wordt gebruik gemaakt van een lange en een korte homologie. De korte homologie kan gebruikt worden tijdens de screening via PCR van correct getargette ES-cel kloons. Er is al homologe recombinatie beschreven met een korte homologie kleiner dan 500 bp (Hasty *et al.*, 1991).

De aanwezigheid van sekwentie verschillen tussen de homologe sekwenties in de vector en de doel locus reduceert de targeting frekwentie (Te Riele *et al.*, 1992), vooral als er geen aanzienlijk stuk van ononderbroken, perfecte homologie aanwezig is (Waldman en Likay, 1988). Daarom wordt aangeraden om bij constructie van de targeting vector DNA te gebruiken geïsoleerd uit bibliotheken die isogeen zijn met de ES-cellen die zullen gebruikt worden (Hasty *et al.*, 2000).

V.1.3. Cre-LoxP systeem

Het Cre-LoxP systeem is een plaats specifiek recombinase systeem dat uit twee elementen bestaat: het recombinase enzym (Cre) en DNA sekwenties die specifiek door dit enzym herkend worden (LoxP). LoxP sekwenties zijn 34 bp groot en bestaan uit twee omgekeerde herhalingen van 13 bp, gescheiden door een 8 bp-sekwentie die de oriëntatie bepaalt. De oriëntatie van de LoxP sekwenties ten opzichte van elkaar bepaalt het type van modificatie dat door het recombinase gekatalyseerd wordt. LoxP sekwenties die in tegenovergestelde richting georiënteerd zijn katalyseren inversie van de tussenliggende sekwentie, terwijl gelijk georiënteerde LoxP sekwenties excisie van het tussenliggende DNA (inclusief 1 LoxP sekwentie) mediëren. LoxP sekwenties die gelegen zijn op verschillende DNA moleculen kunnen uitwisseling mediëren van flankerende sekwenties (stukken van een chromosoom bijvoorbeeld). Een groot voordeel van dit systeem is dat recombinatie tussen twee LoxP sekwenties nog altijd mogelijk is, zelfs wanneer ze meerdere megabasen van elkaar in het genoom verwijderd zijn. Dit systeem wordt dan ook vaak gebruikt voor het creëren van grote deleties. Andere toepassingen waarvoor het Cre-LoxP systeem gebruikt wordt, is het maken van weefselspecifieke mutanten, conditionele knockouts, verwijderen van selectiemerkers, e.a.

V.1.4. Een nieuwe methode voor de constructie van een targeting vector: ET-klonering

ET-klonering is gebaseerd op klonering door middel van recombinatie tussen homologe sekwenties van twee DNA moleculen (2 plasmiden, een lineair fragment en een plasmide, een plasmide en het *E. coli* chromosoom, ...). in *E. coli*. Dit is afhankelijk van de aanwezigheid van RecE en RecT recombinase (vandaar de naam ET-klonering) in de *E. coli* stam. De homologe sekwenties moeten slechts enkele 10-tallen bp lang zijn (vanaf 27 bp werd efficiënte homologe recombinatie vastgesteld) en kunnen dus in een synthetisch oligonucleotide vervat liggen. Op deze manier is het bijvoorbeeld mogelijk om eerst via PCR met 2 oligonucleotiden, waarin homologie met het doel DNA vervat ligt, een selectiemerker te amplificeren en dit lineair fragment vervolgens te introduceren in een *E. coli* stam waarin zich het doel DNA reeds bevindt. Via homologe recombinatie wordt de selectiemerker in het doel DNA gebracht. De homologe sekwenties kunnen zodanig worden gekozen dat de integratie van de selectiemerker een lange en een korte homologie creëert. In een tweede recombinatie ronde kan vervolgens een tweede (negatieve) selectiemerker geïntroduceerd worden, waarna de vector uit de bacteriën kan gezuiverd worden voor electroporatie in ES-cellen (Zhang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1998).

V.2. RESULTATEN

V.2.1. Kloneren en karakteriseren van de muis agp genen

De eerste stap in het maken van een muis met een gerichte transgene deletie is het in kaart brengen van het desbetreffende gen/locus. Dit heeft meerdere redenen: vooreerst is het belangrijk te weten hoe groot het gen is. De grootte van het gen bepaalt namelijk de verdere strategie die zal gebruikt worden. Vervolgens is het noodzakelijk om te weten waar en welke restrictie plaatsen er zich in dit gen bevinden. Deze informatie is kritisch voor zowel de constructie van de targeting vector als voor het opstellen van een betrouwbare screeningsmethode om de correct gemuteerde ES-cel kloons te kunnen identificeren.

Aangezien de drie muis agp genen een hoge graad van homologie vertonen op DNA niveau (~86 %) en aangezien de targeting vector en een goede screeningsmethode de kritische stap zijn in het bekomen van de gewenste ES-cel cloons, en uiteindelijk de gewenste knockout muizen, was het strikt noodzakelijk om een zo gedetailleerd mogelijke map te bekomen van de volledige locus.

Hoewel reeds een deel van de sekwenties van de agp locus gekend waren, werden deze sekwenties toch opnieuw in kaart gebracht worden, aangezien hier gewerkt werd met genomisch DNA van de muizestam 129Sv, en de gepubliceerde sekwenties van C57BL/6 of BALB/c muizen zijn. De reden waarom met genomisch DNA van de 129Sv muizestam gewerkt werd, is omdat zou gebruik gemaakt worden van de R1 ES-cellijn, die afgeleid is van een 129Sv muizestam. Het is immers belangrijk isogeenisch DNA in de ES-cellen te introduceren zodat de homologe recombinatie zo efficiënt mogelijk kan doorgaan.

V.2.1.1. Screenen van een genomische bank

Genomische kloons die overeenstemden met elk van de drie agp genen werden geïsoleerd uit een commerciële faagbank (Lambda FIX II faagbank van Stratagene, verkregen via Prof. Dr. P. Carmeliet, KULeuven). De faagbank werd gescreend met als probe het cDNA van het *agp1* gen (812 bp) van *Mus caroli* dat via een EcoRI digest uit de vector pGEMmAGP geïsoleerd werd (gift van Dr. H. Baumann, Buffalo, NY). Dit cDNA is een allelische vorm van het *agp1* gen bij *Mus musculus* (Prowse en Baumann, 1990). Na een initiële screening van de faagbank met de probe, werden 30 positieve faagkloons weerhouden voor verdere opzuivering. Daarvan bleven uiteindelijk nog 12 positieve faagkloons over, waaruit het DNA geïsoleerd werd.

V.2.1.2. Initiële karakterisatie van de positieve faakloons

Na opzuiveren van de positieve faagkloons werd het stuk genomisch DNA tussen de beide faagarmen gekarakteriseerd op lengte (via een NotI digest) en op de aanwezigheid van een

of meerdere *agp* genen. Daartoe werden in een slot blot experiment 3 probes gebruikt, die elk specifiek waren voor één van de muis *agp* genen.

agp1-4a: 5' CCACCTTATAGTGCTGAGGAAA 3' (*agp1* gen)
agp2-4a: 5' AGACCTGATAGTCTTGAAGATG 3' (*agp2* gen)
agp3-4a: 5' AAACCCTTCTCACCTGAGAGTG 3' (*agp3* gen)

Daaruit bleek dat er enerzijds zowel faagkloons waren die enkel het *agp1* gen (bv. λ 2.1) of enkel het *agp2* gen (bv. λ 14.7) bezaten, en anderzijds waren er faagkloons die het *agp3* gen samen met het *agp2* gen (bv. λ 10.2) en faagkloons die het *agp1* gen samen met het *agp3* gen (bv. λ 4.2) bevatten (fig. V.1). Vooral deze laatste faagkloons waren heel interessant om de afstand te kunnen bepalen tussen het *agp1* en het *agp2* gen, aangezien die nog niet gekend was. Geen enkele faagkloon bevatte echter alle drie de *agp* genen.

		genspecifieke probe			insert lengte (kb)
		<i>agp-1</i>	<i>agp-3</i>	<i>agp-2</i>	
FAAGKLOONS	λ 2.1	—			18.6
	λ 4.1	—			16.7
	λ 4.2	—	—		19.8
	λ 5.2			—	12.9
	λ 8.1	—			15.6
	λ 8.2	—			16.0
	λ 8.3	—	—		18.6
	λ 10.2		—	—	15.6
	λ 11.1		—	—	16.7
	λ 13.2	—			18.6
	λ 13.7	—			18.6
	λ 14.7			—	16.7

Figuur V.1: Voorstelling van de verschillende faagkloons, met de *agp* genen die ze bevatten en de lengte van hun respectievelijke inserts. De eerste kolom duidt de naam van de faagkloon aan. De tweede, derde en vierde kolom vertonen een hybridisatie signaal dat specifiek is voor respectievelijk het *agp1*, het *agp3* en het *agp2* gen.

V.2.1.3. Gedetailleerde karakterisatie van een aantal faagkloons

Een aantal van de faagkloons werd vervolgens onderworpen aan restrictiedigesten met de verscheidene enzymen en combinaties van enzymen.

De geknipte DNA-fragmenten werden

gescheiden via pulsed field gel electroforese en een deel daarvan werd gesubcloneerd in pBluescript. Alhoewel deze werkwijze veel informatie opleverde, waren er toch nog niet voldoende gegevens om reeds een betrouwbare restrictiekaart te kunnen opstellen. Daarom werd de reeds bekomen informatie aangevuld door bijkomende restrictiedigesten uit te voeren op PCR-fragmenten, al dan niet in pGemT gecloneerd. Aangezien een deel van de sekwenties van de *agp* genen reeds gekend waren, was het mogelijk om via specifieke primers bepaalde delen van de *agp* locus te amplificeren en in meer detail te onderzoeken (o.a. via sekwenring).

Op deze manier werd ondermeer de afstand bepaald tussen het *agp1* en het *agp3* gen. De voorwaartse primer (*agp1*-6a; 5' TGA~~ACT~~CCGAGGGCTGTCCACAGG 3') bindt het laatste exon (exon 6) van het *agp1* gen, terwijl de omgekeerde primer (*agp3*-1b; 5' GCTGAGGATACTCAGAGGCACCAGAGC 3') het eerste exon van het *agp3* gen bond. Als template werden faagkloons gebruikt die zowel het *agp1* gen als het *agp3* gen bezaten (λ 4.2 en λ 8.3). Ter controle werd ook faagkloon λ 10.2, die het *agp3* gen en het *agp2* gen bezit, als template gebruikt, om na te gaan of het stuk tussen deze 2 genen ook zou geamplificeerd worden door deze set van primers (figuur V.2).

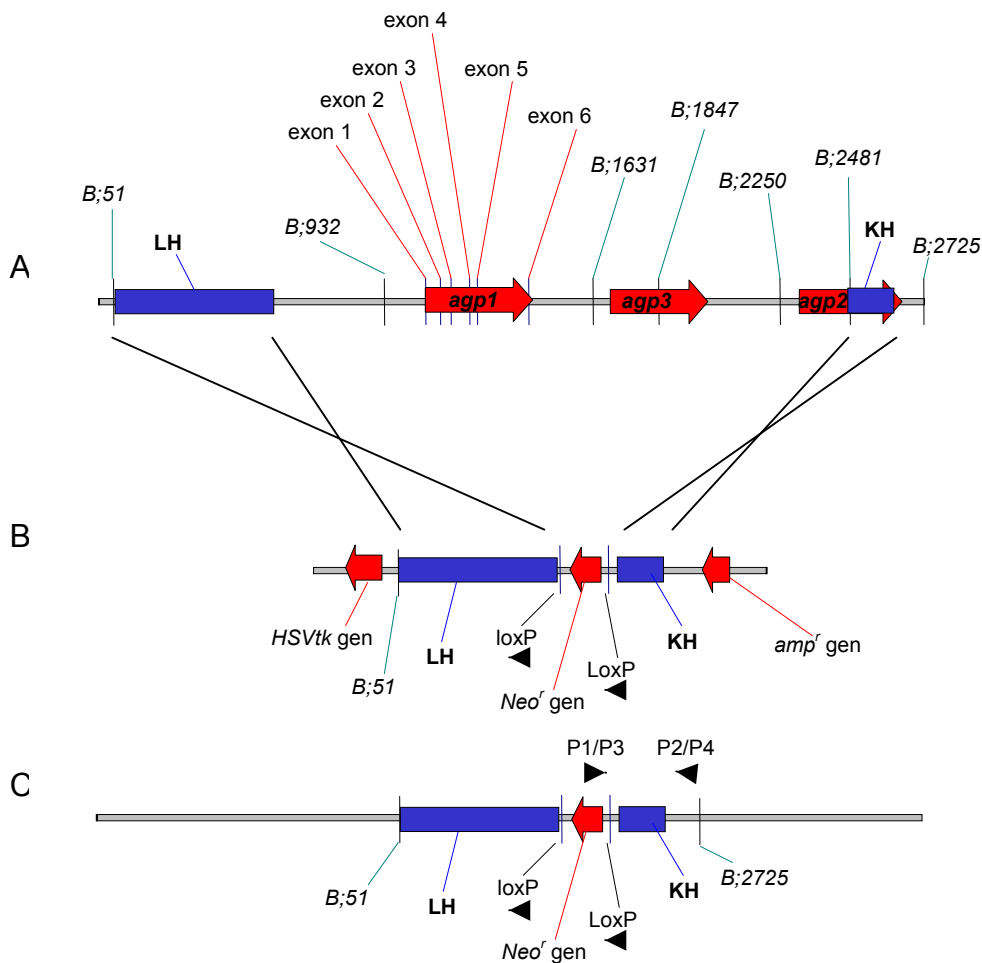


Figuur V.2: Resultaat van de PCR reactie waarbij het fragment tussen het *agp1* en het *agp3* gen geamplificeerd werd. 1, 13 = λ PstI-merker; 3, 5 = amplificatie producten van de reacties met als template het DNA van de λ kloons 4.2 en 8.3 respectievelijk. In beide gevallen werd een fragment van ongeveer 2.5 kb geamplificeerd. 7 = resultaat PCR reactie met als template het DNA van λ kloon 10.2 (negatieve controle leverde inderdaad geen amplificatieproduct op). 9 = negatieve controle voor de PCR reactie zelf.

Deze PCR reactie leverde ons dus meteen de nog ongekende afstand op (~2.5 kb) tussen, alsook de onderlinge oriëntatie (beide in dezelfde oriëntatie gelegen) van het *agp1* en het *agp3* gen. Via restrictiedigesten, PCR, southern blots, subkloning en sekwenning van bepaalde fragmenten, waaronder het volledige *agp1* gen, waarvan enkel de cDNA sekwentie gekend was (Tino Hochedied, ongepubliceerde resultaten), werden de faaginserties grondig gekarakteriseerd en kon er een gedetailleerde restrictiemap opgesteld worden van ongeveer de volledige *agp* locus (figuur V.3). Tijdens de karakterisatie kwamen verscheidene polymorfismen aan het licht ten opzichte van reeds gepubliceerde sekwenties (129/Sv versus C57BL/6), bv. een Sall (GTCGAC) knipplaats in het *agp2* gen van C57BL/6 was bij 129/Sv muizen gemuteerd tot (GTTGAC), waardoor de Sall restrictieplaats verdwenen was (Tino Hochedied, ongepubliceerde resultaten). Er kon ondermeer ook afgeleid worden uit de sekwentiegegevens dat bij 129/Sv muizen het *agp1A* allel voorkomt, zoals ook het geval is bij AKR/J, SJL/J en SWR/J muizen.

V.2.2. Constructie van de targeting vector

Zoals reeds vermeld was de initiële karakterisatie van de *agp* locus een cruciale stap voor de verdere strategie van de knockout. De karakterisatie van de *agp* locus had uitgewezen dat de afstand tussen het *agp1* en het *agp3* gen slechts 2.5 kb was. De volledige *agp* locus bleek dus slechts 15 kb groot te zijn. Dit liet de mogelijkheid om de volledige locus te verwijderen gebruikmakend van slechts één targeting vector. Een alternatief was om gebruik te maken van het Cre-LoxP systeem, dat zich uitstekend leent voor het creëren van zelfs heel grote (100-en kb en groter) deleties (Li, Stark, 1996). Wij hebben echter geopteerd om de *agp* locus met behulp van één targeting vector te verwijderen, en dus niet via het



Figuur V.3: (A) Genomische organisatie van de *agp*-locus. De 3 *agp*-genen (5' → 3': *agp1*, *agp3* en *agp2*) zijn in het rood weergegeven. Van het *agp1* gen zijn de relatieve posities van de 6 exons (blauwe verticale lijnen) weergegeven als representatief voorbeeld voor de 3 *agp* genen. De lange homologie (LH) en korte homologie (KH) zijn weergegeven in het blauw. Er werden een aantal BamHI restrictieplaatsen met de relatieve positie in de *agp* locus (B;x) weergegeven als referentiepunten. (B) De targeting vector gelineariseerd via KpnI (niet vermeld op de figuur). De positieve en negatieve selectiemerkers (*Neo^r* en *HSVtk* gen respectievelijk) en het *amp^r* gen werden in het rood weergegeven. De 2 *LoxP* sekwenties die het *neo^r* gen flankeren werden eveneens aangeduid; de richting ervan werd weergegeven met een pijlpunt. De LH en KH werden in het blauw weergegeven. (C) De *agp* locus na dubbele homologe recombinatie met de LH en KH respectievelijk. Enkel het gefloxe *neo^r* gen (in het rood) is nog aanwezig; de LH en KH zijn opnieuw in het blauw aangeduid. De PCR primers (P1/P3 en P2/P4, zie ook figuur V.4) waarmee gescreend werd zijn weergegeven door zwarte pijlpunten. Twee BamHI restrictieplaatsen die zich ook in de oorspronkelijke *agp* locus bevinden werden als referentiepunten weergegeven.

Cre-LoxP systeem, omdat dergelijke deleties (en ook grotere) reeds beschreven waren in de literatuur, gebruikmakend van een klassieke targeting vector (Mombaerts *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1994). Het gebruik van het Cre-LoxP systeem had ook veel complicaties met zich meegebracht (twee targeting vectoren, dubbele en ingewikkelde screenings strategie (wegens de hoge homologie van de *agp* genen), meerdere electroporaties in ES-cellen, wat de kans op differentiatie verhoogt).

Als basis werd gebruikgemaakt van de vector pPNTneoflox (gift van Dr. M. Dewerchin, KULeuven). De vector bevat een *neomycine fosfotransferase* resistentie (*Neo^r*) gen, geflankeerd door LoxP sekwenties om de selectiemerker achteraf te kunnen verwijderen. Selectiemerkers kunnen namelijk de getargette locus op verschillende manieren beïnvloeden. De regulatie en splicing van het getargette gen kan verstoord worden (in ons geval zou dit echter het geval niet zijn); de expressie van naburige genen (zelfs op een afstand van 100 kb gelegen) kan gewijzigd worden (Ohno *et al.*, 1994; Pham *et al.*, 1996). Daarnaast bevat de vector een *herpes simplex virus thymidine kinase* (*HSVtk*) gen als negatieve selectiemerker en een *ampicilline resistentie* gen (*amp^r*).

Als korte homologie (KH) werd gebruikgemaakt van een EcoRV-fragment van 1.5 kb, dat zich in het 3' eind van het *agp2* gen bevindt. Dit fragment werd gezuiverd uit de vector pBL2.4B, waarin een 2.4 kb BamHI fragment (3' intron 4 tot 5' *agp2* gen) werd gesubkloneerd. Dit werd gekloneerd in een unieke, blunt gemaakte NotI plaats, stroomopwaarts van het *neo^r* gen. De korte homologie omvat een deel van exon 5 en bijna het volledige vijfde intron van het *agp2* gen.

De lange homologie (LH) is een BamHI fragment van 5.5 kb, dat homoloog is met een fragment ongeveer 4 kb 5' van het eerste exon van het *agp1* gen gelegen (figuur V.3). De vector werd uiteindelijk gelineariseerd via KpnI.

V.2.3. Opstellen van een screening strategie

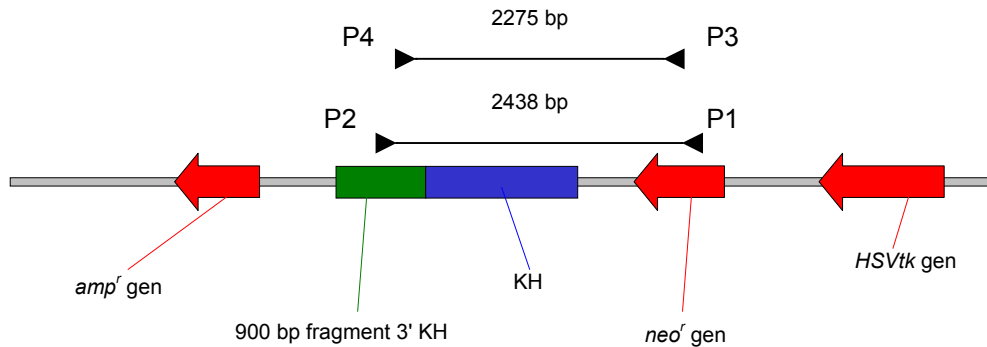
Bij de meeste screening strategieën wordt zowel een PCR- als een southern screening uitgewerkt. De PCR-screening moet toelaten om meerdere ES-cel kloons tegelijk te screenen, terwijl de southern screening vooral dient om de PCR-screening te bevestigen.

V.2.3.1. Screening via PCR

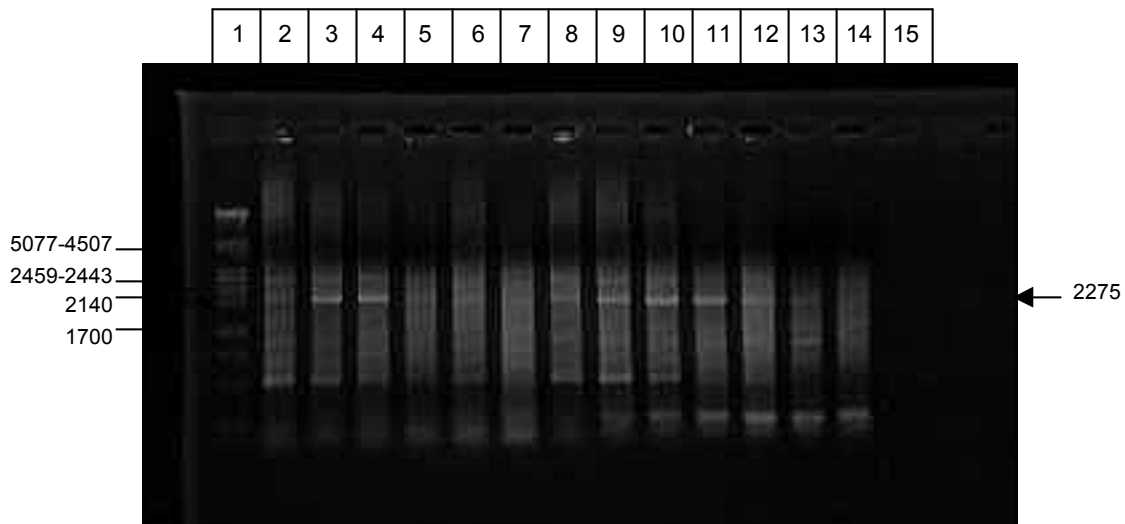
Bij een PCR-screening wordt een fragment geamplificeerd overheen de korte homologie. Daarbij wordt een primer gebruikt die zich tussen de lange- en de korte homologie bevindt P1 (meestal in het *neo^r* gen) en een primer die zich net buiten de korte homologie bevindt, in de doel locus (P2). Om na te gaan of de PCR-screening werkt, dient een vector gemaakt te worden waarin zich de korte homologie bevindt + nog een stukje 5' van de korte homologie, waarin P2 kan binden. Deze vector dient dan opgemengd te worden met een 10^6 x overmaat

genomisch DNA (detectie van ~1 kb DNA in een totale pool van 10^9 bp) om de gevoeligheid van de PCR-reactie zo getrouw mogelijk na te bootsen.

De PCR-screening was echter enkel gevoelig genoeg wanneer een nested PCR uitgevoerd werd. Er werd een initiële PCR uitgevoerd met de primers P1 en P2, en vervolgens werd op dit PCR-mengsel een additionele PCR uitgevoerd met twee interne primers P3 en P4. Dit gaf een uiteindelijk fragment van 2275 bp (figuur V.4) en er kon tot 0.1 pg controle construct gedetecteerd worden in aanwezigheid van 1 μ g genomische DNA (= $1/10^7$) (figuur V.5).



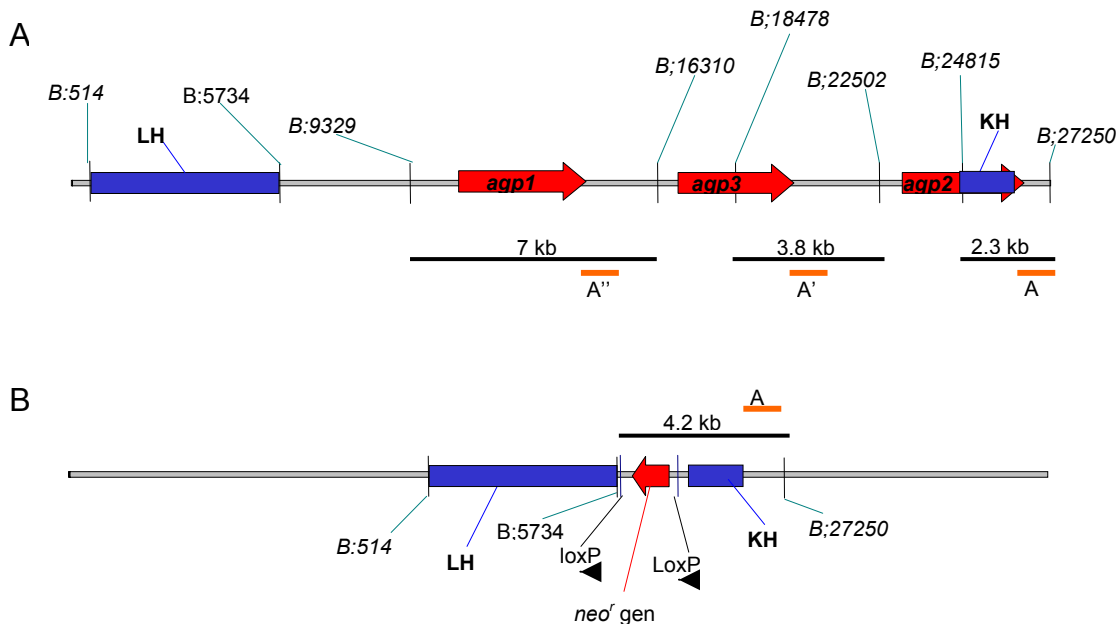
Figuur V.4: Voorstelling van de vector die dienst doet als PCR controle (pBL 2.4B-10). Omwille van de duidelijkheid werd de vector gelineariseerd voorgesteld. In de vector zit de KH gekloneerd + nog 900 bp extra langs de 3' kant (in het genoom) van de KH. Primer P1 bindt in het *neo^r* gen, terwijl primer P2 3' buiten de KH bindt. P1 en P2 geven een fragment van 2438 bp. Voor de nester PCR zijn er twee extra, interne primers. P3 bindt 5' van P1 en P4 bindt 3' van P2. Beide primers resulteren in een fragment van 2275 bp.



Figuur V.5: PCR-screening op controle vector in aan- en afwezigheid van genomisch DNA. 1 = λ PstI merker, 2-7 = nested PCR in afwezigheid van genomisch DNA en met als template 2 - 0.00002 ng/ml controle vector (10-voudige verdunningen); 8-14 = nested PCR in aanwezigheid van 1 μ g genomisch DNA en met als template 2 - 0.00002 ng/ml controle vector (10-voudige verdunningen); 15 = negatieve controle.

V.2.3.2. Screening via southern blot

De southern-screening gebeurde met een 900 bp probe 3' van de KH (of 3' van het *agp2* gen), die via een BamHI-EcoRV digest uit de vector pBI2.4B gezuiverd werd. Het genomisch DNA werd geknipt met BamHI. Wegens de hoge homologie van de *agp* genen echter was het heel waarschijnlijk dat deze probe eveneens zou hybridiseren met het 3' eind van het *agp1* en van het *agp3* gen. Bij een wt allel werden dus 3 hybridisatiesignalen verwacht (figuur V.6).



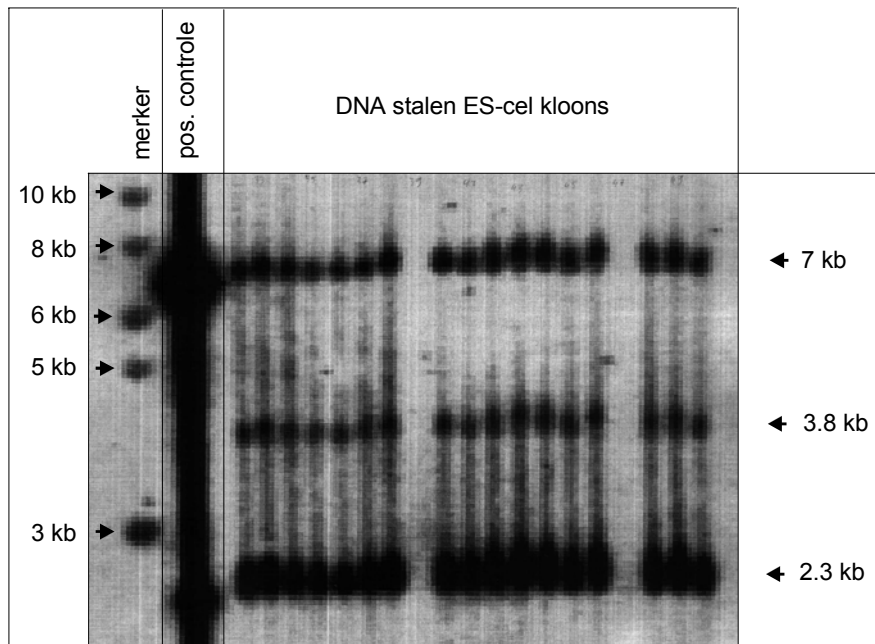
Figuur V.6: Strategie voor de southern-screening. (A) *agp* locus met de drie *agp* genen (rood) en de LH en KH (blauw). Probe A (oranje) waarmee gescreend zou worden bindt zich 3' van de KH en hybridiseert met een BamHI fragment van 2.3 kb (zwarte lijn). Wegens de hoge homologie van de *agp* genen zal de probe echter heel waarschijnlijk binden met het 3' eind van *agp3* (A') en met het 3' eind van *agp1* (A'') en daardoor met een BamHI fragment van respectievelijk 3.8 en 7 kb hybridiseren (zwarte lijnen). (B) *agp* locus na correcte targeting met het gefloxe *neo^r* gen (rood; de richting van de loxP sekwenties is weergegeven met een pijlpunt), de LH en KH (blauw) en probe A (oranje) die met een BamHI fragment van 4.2 kb hybridiseert en dus een extra signaal zou moeten opleveren naast de reeds aanwezige wt bandjes van figuur V.6A.

Naast deze initiële southern-screening kon een eventueel positieve kloon nog verder bevestigd worden via een screening met een probe in het *neo^r* gen of een interne probe in de LH, maar deze werden hier niet weergegeven.

V.2.4. Eigenlijke screening van de ES-cellen

Aangezien de PCR-screening enkel een fragment van de gewenste lengte oplevert wanneer er een positieve kloon is, werd vooral gebruik gemaakt van de southern-screening, omdat hierbij ook de negatieve kloons een signaal opleveren. Een voorbeeld van een southern blot op een aantal van de ES-cel kloons werd weergegeven in figuur V.7. Door een verschil in graad van homologie tussen de probe en de fragmenten waarmee de probe hybridiseert, is

het mogelijk een verschil in intensiteit te zien in de verschillende hybridisatiesignalen. Aangezien de probe afkomstig is van het 3' eind van het *agp2* gen, zal het BamHI-fragment dat dit fragment bevat (2.3 kb band) dan ook het meest intense signaal geven. Het 3' eind van het *agp3* gen vertoont het minst homologie met de probe en geeft dus het minst intense signaal (3.8 kb fragment). Een correct getargette ES-cel kloon zou dus een extra hybridisatiesignaal moeten geven van 4.2 kb, waarvan de intensiteit dezelfde is als deze van het 2.3 kb signaal.



Figuur V.7: Southern blot en hybridisatie met probe A van een aantal ES-cel kloons en een positieve controle. De merker, waarvan de grootte van de respectievelijke banden is aangeduid, bevindt zich in laan 1. In laan 2 bevindt zich een positieve controle, die de 3 wt banden weergeeft (7 kb, 3.8 kb (niet duidelijk op deze figuur) en 2.3 kb). In de overige laantjes bevinden zich verschillende ES-cel kloons, die dezelfde banden vertonen als de positieve controle (en geen extra band van 4.2 kb, die duidt op een correcte targeting).

V.2.5. Resultaat van de ES cel screening

Bij een eerste electroporatie van de targeting vector werden er van de ES-cel kloons die de selectie overleefd hebben 468 gescreend via southern blot, met behulp van probe A. Hierbij bleek geen enkele correct getargette ES-cel kloon te zitten.

Daarom werd er een tweede electroporatie uitgevoerd met dezelfde targeting vector, maar op een andere plaats gelineariseerd (Eco47III, hierdoor bevindt het HSVtk gen zich niet meer helemaal op het uiteinde van de gelineariseerde vector (zie verder)). Deze ES-cel kloons (ongeveer 350) zijn bij het ter perse gaan van deze doctoraatsthesis echter nog niet gescreend geworden.

V.2.6. Bespreking

De initiële karakterisatie van de positieve faagkloons is een cruciale stap in de ontwikkeling van knockout muizen. Deze karakterisatie levert ondermeer restrictie- en sekwentiegegevens op. In de literatuur was al een deel sekwentiegegevens van de *agp* genen gekend, maar de sekwenties waren afkomstig van C57BL/6 of BALB/c muizen. Aangezien wij met DNA werkten van 129/Sv muizen, kon niet *a priori* vertrouwd worden op de reeds gepubliceerde sekwentie- en restrictiegegevens. Dit is tijdens de karakterisatie ook gebleken. Er werden een aantal polymorfismen gevonden tussen 129/Sv DNA en C57BL/6 DNA waarbij restrictieplaatsen (voor enzymen die gebruikt werden tijdens de karakterisatie) gemuteerd waren.

In ons geval leverde de karakterisatie ook belangrijke informatie op omtrent de afstand tussen het *agp1* en het *agp3* gen. Andere onderzoeksgroepen hadden eerder al faagkloons opgepikt waarin één of twee *agp* genen (*agp3* en *agp2*) samen aanwezig waren, maar niet waarin *agp1* en *agp3* samen aanwezig waren (Chang *et al.*, 1992). Hun voorspelling omtrent de genomische oriëntatie van de drie *agp* genen ten opzichte van elkaar (ondermeer gebaseerd op de vinding dat *agp1* meest proximaal bij het centromeer ligt (Baumann *et al.*, 1984)) werd door ons bevestigd. We hebben aangetoond dat het *agp1* (exon6) en het *agp3* gen (exon1) slechts 2.5 kb van elkaar verwijderd liggen, dit is ongeveer dezelfde afstand tussen het *agp3* en het *agp2* gen (Chang *et al.*, 1992). De volledige *agp* locus bleek dus slechts 15 kb groot te zijn. Een deletie van dergelijke grootte is overbrugbaar door middel van één enkele klassieke targetting vector (Mombaerts *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1994). Zhang *et al.* hebben zelfs gevonden dat de frekwentie van targetting voor een deletie van 19.2 kb dezelfde was als voor een deletie van 3 kb. Bovendien, indien als alternatief het Cre-LoxP systeem gekozen werd, zouden 2 targetting vectoren moeten gemaakt worden. Dit betekent ook het maken van meerdere PCR controle constructen, het op punt stellen van meerdere screening strategieën en het meermaals electroporeren van de ES-cellen, wat de kans op differentiatie verhoogt. Daarom werd geopteerd om gebruik te maken van een klassieke targetting vector.

Samen met de strategie voor het construeren van een targetting vector, moet ook al een strategie voor de screening van de ES-cellen uitgewerkt worden. Wegens de sterke homologie van de *agp* genen bleek dit niet voor de hand liggend. Uiteindelijk werd geopteerd voor een lange homologie een 4 kb 5' van het eerste exon van het *agp1* gen gelegen en een korte homologie in het 3' eind van het *agp2* gen. Na correcte targetting zouden de drie *agp* genen verwijderd zijn uitgezonderd een stukje van exon 5 en het volledige exon 6 van het *agp2* gen. Er werd tevens een screening strategie uitgewerkt die ondanks het voorkomen van meerdere hybridisatiesignalen toch toeliet om een eventueel positieve kloon te herkennen. Dit zowel op basis van fragment lengte als op basis van de intensiteit van het hybridisatiesignaal. Daarnaast werd eveneens een PCR reactie op punt gesteld, maar

aangezien deze geen signaal geeft bij wt ES-cellen, werd vooral gebruik gemaakt van de southern screening.

Van de 468 gescreende ES-cel kloons bleek er echter geen enkele positieve bij te zitten. Blijkbaar ligt de targeting frekwentie dus bijzonder laag. Daarvoor kunnen verscheidene mogelijke oorzaken aangehaald worden:

(i) de grootte van de deletie: In de literatuur zijn al een aantal voorbeelden van dergelijk grote deleties. In de literatuur verschijnen echter enkel de succesvolle pogingen, terwijl dit misschien een fractie is van alle pogingen die al ondernomen zijn om een grote deletie te maken via een klassieke targeting vector.

(ii) de lengte van de homologie: bij de twee voorbeelden die aangehaald werden van succesvolle grote deleties via een klassieke targeting vector werd telkens een korte homologie gebruikt van 2.5 kb. De totale homologie was 8.8 kb (Mombaerts *et al.*, 1991) in het ene en 5 kb (Zhang *et al.*, 1994) in het andere geval. In ons geval is de totale homologie 7 kb, maar de korte homologie is 'slechts' 1.5 kb. Alhoewel dit ruim voldoende is voor het maken van een 'conventionele' knockout (Hasty *et al.*, 1991), is de korte homologie misschien te klein voor het maken van grote deleties.

(iii) een onvoldoende negatieve selectie: de negatieve selectie levert in veel gevallen slechts een kleine aanrijking op (2x). Er zijn al verschillende hypothesen geopperd om dit zwakke effect te verklaren. Een eerste hypothese is dat de negatieve selectiemerker door de electroporatie zou beschadigd zijn en niet meer (optimaal) zou functioneren. Als mogelijke oplossing werd voorgesteld om 2 negatieve selectiemerkers te gebruiken (Hasty *et al.*, 2000). Een andere hypothese is dat de uiteinden van de targeting vector door nucleasen in de ES-cellen aangetast worden. Indien de negatieve selectiemerker te dicht aan het uiteinde van de gelineariseerde vector ligt (in ons geval enkele 10-tallen bp) kan dit de functie ervan ook drastisch beïnvloeden.

(iv) isogeniciteit van de targeting vector: Om de homologe recombinatie zo efficiënt mogelijk te laten verlopen is het gebruik van isogeen DNA een cruciale factor (Te Riele *et al.*, 1992). Wanneer echter gewerkt wordt met DNA van 129-muizen, is dit niet altijd vanzelfsprekend. De R1 ES-cel lijn (die wij gebruikt hebben) is eigenlijk een F1 hybride tussen 129/SvJ-*Tyr^{ch}* *p/Tyr^cp* (of kortweg 129/SvJ) en 129/Sv-+^{*Tyr+p*} (Nagy *et al.*, 1993). De 129/SvJ stam is echter sterk gecontamineerd; 1/4 tot 1/5 van dit genoom is DNA van niet-129 oorsprong (een deel komt ondermeer van C3HeB/FeJ (Taylor *et al.*, 1996) en C57BL/6 (Threadgill *et al.*, 1997)). De meest gebruikte bibliotheken om de targeting vector te maken zijn afkomstig van 129/SvJ muizen (ondermeer de λ FIXII bibliotheek die wij gebruikt hebben). Aangezien isogeen DNA kritisch is voor een efficiënte homologe recombinatie in ES-cellen zullen targeting experimenten waarbij gebruik wordt gemaakt van DNA uit 129/SvJ-afgeleide bibliotheken in van 129/Sv-+^{*Tyr+p*} afgeleide ES-cellen (o.a. R1 ES-cellen) een suboptimaal resultaat vertonen, afhankelijk van de plaats in het genoom waar het doel gen zich bevindt. Er zijn

inderdaad al een aantal ongepubliceerde gevallen gekend waar geen homologe recombinatie bekomen werd (B. Hogan, R. Chinery, S. Kendall, T. Magnuson). Telkens bevond de probleem locus zich in een niet-129 regio van de 129/SvJ stam (Threadgill *et al.*, 1997)). De agp locus is ook in dergelijke niet-129 regio gelegen.

REFERENTIES

- Abe, K., Yamamoto, K., and Sinohara, H. (1989) Proteinase inhibitory spectrum of mouse murinoglobulin and α -macroglobulin. *Biochem J* 106:564-568
- Agneray, J. (1989) Glycan microheterogeneity forms of alpha₁-acid glycoprotein (AGP): their identification in biological fluids and variations in their relative proportions in disease states. In: Alpha₁-acid glycoprotein: genetics, biochemistry, physiological functions and pharmacology. Baumann, P., Müller, W. E., Eap, C. B., and Tillement, J.-P., eds. Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 47-65
- Akiyama, K., Simons, E. R., Bernasconi, P., Schmid, K., van Halbeek, H., Vliegenthart, J.F., Haupt, H., and Schwick, H.G. (1984) The structure of the carbohydrate units of human plasma galactoglycoprotein determined by 500-megahertz ¹H NMR spectroscopy. *J Biol Chem* 259:7151-7154
- Alam, T., and Papaconstantinou, J. (1992) Interaction of acute-phase-inducible and liver-enriched nuclear factors with the promoter region of the mouse alpha₁-acid glycoprotein gene-1. *Biochemistry* 31:1928-1936
- Alam, T., An, M. R., Mifflin, R. C., Hsieh, C. C., Ge, X., and Papaconstantinou, J. (1993) Trans-activation of the alpha₁-acid glycoprotein gene acute phase responsive element by multiple isoforms of C/EBP and glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 268:15681-15688
- Amiot, F., Fitting, C., Tracey, K. J., Cavaillon, J.-M., and Dautry, F. (1997) Lipopolysaccharide-induced cytokine cascade and lethality in LT α /TNF α -deficient mice. *Mol Med* 3:864-875
- Andersen, U. O., Bog-Hansen, T. C., and Kirkeby, S. (1996) Lectin-like receptor for alpha₁-acid glycoprotein in the epithelium of the rat prostate gland and seminal vesicles. *Prostate* 29:356-361
- Andersen, U. O., Kirkeby, S., Bog-Hansen, T. C. (1996) Two lectin-like receptors for alpha₁-acid glycoprotein in mouse testis. *J Mol Recognit* 9:364-367
- Andre, C., Descos, L., Andre, F., Vignal, J., Landais, P., and Permanian, J. (1985) Biological measurements of Crohn's disease activity – a reassessment. *Hepato-gastroenterology* 32:135-137
- Andres, P. G., and Friedman, L. S. (1999) Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 28:255-281
- Armstrong, P. B., and Quigley, J. P. (1987) Limulus α_2 -macroglobulin. First evidence in an invertebrate for a protein containing an internal thiol ester bond. *Biochem J* 248:703-707
- Armstrong, P. B., and Quigley, J. P. (1999) Alpha₂-macroglobulin: an evolutionary conserved arm of innate immune system. *Dev Comp Immunol* 23:375-390
- Ashwell, G., and Morell, A. G. (1974) The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv Enzymol* 41:99-128
- Ashwell, G., and Harford, N. (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem* 51:531-554
- Atemezem, A., Mbemba, E., Vassy, R., Slimani, H., Saffar, L., and Gattegno, L. (2001) Human α_1 -acid glycoprotein binds to CCR5 expressed on the plasma membrane of human primary macrophages. *Biochem J* 356:121-128
- Aubert, J.-P., and Loucheux-Lefebvre, M. H., (1976) Conformational study of alpha-1-acid glycoprotein. *Arch Biochem Biophys* 175:400-409

- Azuma, Y., Murata, M., and Matsumoto, K. (2000) Alteration of sugar chains on alpha(1)-acid glycoprotein secreted following cytokine stimulation of HuH-7 cells in vitro. *Clin Chim Acta* 294:93-103
- Bailie, M. B., Standiford, T. J., Laichalk, L. L., Coffey, M. J., Strieter, R., and Peters-Golden, M. (1996) Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumoniae* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *J Immunol* 157:5221-5224
- Banda, M. J., Rice, A. G., Griffin, G. L., and Senior, R. M. (1988) alpha₁-proteinase inhibitor is a neutrophil chemoattractant after proteolytic inactivation by a macrophage elastase. *J Biol Chem* 263:4481-4484
- Bank, U., and Ansorge, S. (2001) More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control. *J Leukoc Biol* 69:197-206
- Barrett, A. J., and Starkey, P. M. (1973) The interaction of alpha₂-macroglobulin with proteinases: characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem J* 133: 709-724
- Baumann, H., Held, W. A., and Berger, F. G. (1984) The acute phase response of mouse liver. Genetic analysis of the major acute phase reactants. *J Biol Chem* 259:566-573
- Baumann, H., and Maquat, L. E. (1986) Localization of DNA sequences involved in dexamethasone-dependent expression of the rat alpha₁-acid glycoprotein gene. *Mol Cell Biol* 6:2551-2561
- Baumann, H., Richards, C., and Gauldie, J. (1987) Interaction among hepatocyte-stimulating factors, interleukin 1, and glucocorticoids for regulation of acute phase plasma proteins in human hepatoma (HepG2) cells. *J Immunol* 139:4122-4128
- Baumann, H., Prowse, K. R., Won, K.-A., and Marinkovic-Pajovic, S. (1989a) Regulation of alpha₁-acid glycoprotein genes and relationship to other type 1 acute phase plasma proteins. In: *Acute phase proteins: molecular biology, biochemistry and clinical applications*. Mackiewicz, A., Kushner, I., and Baumann, H., eds. CRC Press, Boca Raton, pp. 409-423
- Baumann, H., Prowse, K. R., Marinkovic, S., Won, K., and Jahreis, G. P. (1989b) Stimulation of hepatic acute phase response by cytokines and glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci* 557:280-296
- Baumann, H. (1989c) Hepatic acute phase reaction in vitro and in vivo. *In Vitro Cell Dev Biol* 25:115-126
- Baumann, H., and Gauldie, J. (1990) Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol Biol Med* 7:147-159
- Baumann, H., Jahreis, G. P., Morella, K. K., Won, K.-A., Pruitt, S. C., Jones, V. E., and Prowse, K. R. (1991) Transcription regulation through cytokine- and glucocorticoid-response elements of rat acute phase plasma protein genes by C/EBP/β and JunB. *J Biol Chem* 266:10390-20399
- Baumann, H., Morella, K. K., Campos, S. P., Cao, Z., and Jahreis, G. P. (1992) Role of C/EBP isoforms in the cytokine regulation of acute phase plasma protein genes. *J Biol Chem* 267:19744-19751
- Baumann, H., Prowse, K. R., won, K.-A., and Marinkovic-Pajovic, S. (1993a) Regulation of alpha₁-acid glycoprotein genes and relationship to other type 1 acute phase plasma proteins. In: *Acute phase proteins: molecular biology, biochemistry and clinical applications*. Mackiewicz, A., Kushner, I., Baumann, H., eds. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 409-423
- Baumann, H., Morella, K. K., and Campos, S. P. (1993b) Interleukin-6 signal communication to the alpha₁-acid glycoprotein gene, but not junB gene, is impaired in HTC cells. *J Biol Chem* 268:10495-10500
- Baumann, H., and Gauldie, J. (1994) The acute phase response. *Immunol Today* 15:74-80

- Belaouaj, A., McCarthy, R., Baumann, M., Gao, Z., Ley, T. J., Abraham, S. N., and Shapiro, S. D. (1998) Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nature Medicine* 4:615-618
- Bennet, M., and Schmidt, K. (1980) Immunosuppression by human plasma α_1 -acid glycoprotein: importance of the carbohydrate moiety. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6109-6113
- Bensi, G., Raugei, G., Klefenz, H., and Cortese, R. (1985) Structure and expression of the human haptoglobin locus. *EMBO J* 4:119-126
- Beutler, B., Milsark, I. W., and Cerami, A. C. (1985) Passive immunisation against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229:869-871
- Biennu, J., Sann, L., Biennu, F., Lahet, C., Divry, P., Cotte, J., and Bethenod, M. (1981) laser nephelometry of orosomucoid in serum of newborns: reference intervals and relation to bacterial infections. *Clin Chem* 27:721-726
- Bierhuizen, M. F. A., De Wit, M., Govers, C. A. R. L., Ferwerda, W., Koeleman, C., Pos, O., and Van Dijk, W. (1988) Glycosylation of three molecular forms of human α_1 -acid glycoprotein having different interactions with concanavalin A. Variations in the occurrence of di-, tri-, and tetraantennary glycans and the degree of glycosylation. *Eur J Biochem* 175:387-394
- Biou, D., Monnet, D., Millet, F., Feger, J., and Durand, G. (1984) An immunochemical procedure to evaluate the degree of desialylation of alpha₁-acid glycoprotein in rat serum. *J Immunol Method* 74:267-271
- Blacker, D., Wilcox, M. A., Laird, N. M., Rodes, L., Horvath, S. M., Go, R. C. P., Perry, R., Watson, Jr., B., Bassett, S. S., McInnis, M. G., Albert, M. S., Hyman, B. T., and Tanzi, R. E. (1998) Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nature Genetics* 19:357-360
- Blain, P. G., Mucklow, J. C., Rawlins, M. D., Roberts, D. F., Routledge, P. A., and Shand, D. G. (1985) Determinants of plasma α_1 -acid glycoprotein (AAG) concentration in health. *Br J Clin Pharmacol* 20:500-502
- Blumberg, R. S., Saubermann, L. J., and Strober, W. (1999) Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol* 11:648-656
- Board, P. G., Jones, I. M., and Bentley, A. K. (1986) Molecular cloning and nucleotide sequence of human α_1 -acid glycoprotein cDNA. *Gene* 44:127-131
- Borish, L., King, M. S., Mascali, J. J., Johnson, S., Coll, B., and Rosenwasser, L. J. (1992) Transthyretin is an inhibitor of monocyte and endothelial cell interleukin-1 production. *Inflammation* 16:471-484
- Borth, W., and Teodorescu, M. (1986) Inactivation of human interleukin-2 (IL-2) by alpha₂-macroglobulin-trypsin complexes. *Immunology* 57:367-371
- Borth, W., and Luger, T. A. (1989) Identification of α_2 -macroglobulin as a cytokine binding plasma protein. *J Biol Chem* 264:5818-5825
- Borth, W., Scheer, B., Urbansky, A., Luger, T. A., and Sottrup-Jensen, L. (1990) Binding of IL-1 beta to alpha-macroglobulins and release by thioredoxin. *J Immunol* 145:3747-3754
- Boutten, A., Dehoux, M., Deschenes, M., Rouzeau, J.-D., Bories, P. N., and Durand, G. (1992) α_1 -Acid glycoprotein potentiates lipopolysaccharide-induced secretion of interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor- α by human monocytes and alveolar and peritoneal macrophages. *Eur J Immunol* 22:2687-2695

- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., and Robertson, E. (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309:255-256
- Breborowicz, J., Gorny, A., Drews, K., and Mackiewicz, A. (1992) Glycoforms of α_1 -acid glycoprotein in cancer. In: *Affinity Electrophoresis: Principles and application*. Breborowicz, J., and Mackiewicz, A., eds. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 191
- Brinkman-Van der Linden, E. C. M., Van Ommen, E. C. R., and Van Dijk, W. (1996a) Glycosylation of alpha₁-acid glycoprotein in septic shock: changes in degree of branching and in the expression of Sialyl Lewisx groups. *Glycoconjugate J* 13:27-31
- Brinkman-Van der Linden, E. C., Mollicone, R., Oriol, R., Larson, G., Van den Eijnden, D. H., and Van Dijk, W. (1996b) A missense mutation in the FUT6 gene results in total absence of alpha₃-fucosylation of human alpha₁-acid glycoprotein. *J Biol Chem* 271:14492-14495
- Brinkman-Van der Linden, E. C. M., De Haan, P. F., Havenaar, E. C., and Van Dijk, W. (1998) Inflammation induced expression of sialyl Lewisx is not restricted to alpha₁-acid glycoprotein, but also occurs to a lesser extent on alpha₁-antichymotrypsin and haptoglobin. *Glycoconjugate J* 15:177-182
- Brynskov, J., Freund, L., Rasmussen, S. N., Lauritsen, K., de Muckadell, O. S., Williams, N., MacDonald, A. S., Tanton, R., Molina, F., Campanini, M. C., et al. (1989) A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of cyclosporine therapy in active chronic Crohn's disease. *N Engl J Med* 321:845-850
- Bürgi, W. (1989) Prof. Karl Schmid Ph.D.: Achievement through engagement. In: *Alpha₁-acid glycoprotein: genetics, biochemistry, physiological functions, and pharmacology*. Baumann, P., Müller, W. E., Eap, C. B., and Tillement, J.-P., eds. pp. 1-5
- Campos, S. P., and Baumann, H. (1992) Insulin is a prominent modulator of the cytokine-stimulated expression of acute-phase plasma protein genes. *Mol Cell Biol* 12:1789-1799
- Carpentier, V., Midoux, P., Monsigny, M., and Roche, A.-C. (1993) Endocytosis of α_1 -acid glycoprotein variants by human monocytic lineage cells. *Biol Cell* 77:187-193
- Carter, K. C., Bryan, S., Gadson, P., and Papaconstantinou, J. C. (1989) Deadenylation of α_1 -acid glycoprotein mRNA in cultured hepatic cells during stimulation by dexamethasone. *J Biol Chem* 264:4112-4119
- Cassatella, M. A. (1995) The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 16:21-26
- Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., David, M., Andus, T., Geiger, T., Trullenque, R., Fabra, R., and Heinrich, P. (1989) Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett* 242:237-239
- Chang, C.-J., Chen, T.-T., Lei, H.-Y., Chen, D.-S., and Lee, S.-C. (1990) Molecular cloning of a transcription factor, AGP/EBP, that belongs to members of the C/EBP family. *Mol Cell Biol* 10:6642-6653
- Chang, C.-J., Lai, M.-Y., Chen, D.-S., and Lee, S.-C. (1992) Structure and expression of mouse α_1 -acid glycoprotein gene-3 (AGP-3). *DNA Cell Biol* 11:315-320
- Chang, C.-J., Chen, Y.-L., and Lee, S.-C. (1998) Coactivator TIF1beta interacts with transcription factor C/EBPbeta and glucocorticoid receptor to induce alpha₁-acid glycoprotein gene expression. *Mol Cell Biol* 18:5880-5887
- Chedid, L., Parant, M., Parant, F., Lefrancier, P., Choay, J., and Lederer, E. (1977) Enhancement of nonspecific immunity to *Klebsiella pneumoniae* infection by a synthetic immunoadjuvant (N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) and several analogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:2089-2093

- Chiu, K. M., Mortensen, R. F., Osmand, A. P., Gewurz, H. (1977) Interactions of alpha₁-acid glycoprotein with the immune system. I. Purification and effects upon lymphocyte responsiveness. *Immunology* 32: 997-1005.
- Chu, C. T., and Pizzo, S. V. (1993) Receptor-mediated antigen delivery into macrophages. Complexing antigen to alpha₂-macroglobulin enhances presentation to T cells. *J Immunol* 150:48-58
- Cid, M. C., Grant, D. S., Hoffman, G. S., Auerbach, R., Fauci, A. S., and Kleinman, H. K. (1993) Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. *J Clin Invest* 91:977-985
- Clawson, G. A., Button, J., Woo, C. H., Liao, Y.-C., Smuckler, E. A. (1986) In vitro release of alpha₁-acid glycoprotein RNA sequences shows fidelity with the acute phase response in vivo. *Mol Biol Rep* 11:163-172
- Colotta, F., Sironi, M., Borre, A., Luini, W., Maddalena, F., Mantovani, A. (1992) Interleukin 4 amplifies monocyte chemotactic protein and interleukin 6 production by endothelial cells. *Cytokine* 4:24-28
- Cong, Y., Brandwein, S. L., McCabe, R. P., Lazenby, A., Birkenmeier, E. H., Sundberg, J. P., and Elson, C. O. (1998) Genes, bacteria, and T cells: ingredients for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 115:1595-1600
- Cooper, R., and Papaconstantinou, J. (1986) Evidence for the existence of multiple alpha₁-acid glycoprotein genes in the mouse. *J Biol Chem* 261:1849-1853
- Cooper, R., Eckley, D. M., and Papaconstantinou, J. (1987) Nucleotide sequence of the mouse alpha₁-acid glycoprotein gene. *Biochemistry* 26:5244-5250
- Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S., and Sedergran, D. J. (1993) Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 69:238-249
- Costello, M., Fiedel, B. A., and Gewurz, H. (1979) Inhibition of platelet aggregation by native and desialised alpha₁-acid glycoprotein. *Nature (London)* 281:677-678
- Cox, D. W., and Francke, U. (1985) Direct assignment of orosomucoid to human chromosome 9 and alpha₂HS-glycoprotein to chromosome 3 using human fetal liver x rat hepatoma hybrids. *Hum Genet* 70:109-115
- Crestani, B., Rolland, C., Lardeux, B., Fournier, T., Bernuau, D., Pous, C., Vissuzaine, C., Li, L., and Aubier, M. (1998) Inducible expression of the alpha₁-acid glycoprotein by rat and human type II alveolar epithelial cells. *J Immunol* 160:4596-4605
- Cummings, R. D., and Smith D. F. (1992) The selectin family of carbohydrate-binding proteins: structure and importance of carbohydrate ligands for cell adhesion. *Bioessays* 14:849-856
- Dage, J. L., Ackermann, B. L., and Halsall, H. B. (1998) Site localization of sialyl Lewis(x) antigen on alpha₁-acid glycoprotein by high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Glycobiology* 8:755-760
- Davies, D. E., Polosa, R., Puddicombe, S. M., Richter, A., and Holgate, S. T. (1999) The epidermal growth factor and its ligand family: their potential role in repair and remodelling in asthma. *Allergy* 54:771-783
- De Bosscher, K., Schmitz, M. L., Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Fiers, W., and Haegeman, G. (1997) Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-KB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13504-13509
- De Graaf, T. W., Van der Stelt, M. E., Anbergen, M. G., and van Dijk, W. (1993) Inflammation induced expression of sialyl Lewis X-containing glycan structures on alpha₁-acid glycoprotein (orosomucoid) in human sera. *J Exp Med* 177:657-666

- De Vries, T., and Van den Eijnden, D. H. (1992) Occurrence and specificities of α_3 -fucosyltransferases. *Histochemical J* 24:761-770
- De Vries, T., Van den Eijnden, D. H., Schultz, J. E., and O'Neill, R. A. (1993) Efficient enzymatic synthesis of the Sialyl-Lewis^x tetrasaccharide: a ligand for selectin-type adhesion molecules. *FEBS Lett* 330:243-248
- de Waal Malefyt, R., Yssel, H., and Roncarolo, M. G., Spits, H., and de Vries, J. E. (1992) Interleukin-10. *Curr Opin Immunol* 4:314-320
- Dejana, E., Zanetti, A., and Conforti, G. (1988) Biochemical and functional characteristics of fibrinogen interaction with endothelial cells. *Haemostasis* 18:262-270
- del Zoppo, G. J., and Hallenbeck, J. M. (2000) Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb Res* 98:73-81
- Delain, E., Pochon, F., Barray, M., and Van Leuven, F. (1992) Ultrastructure of α_2 -macroglobulins. *Electron Microsc Rev* 5:231-281
- Dennis, P. A., Saksela, O., Harpel, P., and Rifkin, D. B. (1989) *J Biol Chem* 264:7210-7216
- Dente, L., Ciliberto, G., and Cortese, R. (1985) Structure of the human α_1 -acid glycoprotein gene: sequence homology with other human acute phase protein genes. *Nucleic Acid Research* 13:3941-3952
- Dente, L., Pizza, M. G., Metspalu, A., and Cortese, R. (1987) Structure and expression of the genes coding for human α_1 -acid glycoprotein. *EMBO J* 6:2289-2296
- Descombes, P., Chojkier, M., Lichsteiner, S., Falvey, E., and Schibler, U. (1990) LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver -enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev* 4:1541-1551
- Dewey, M. J., Rheaume, C., Berger, F. G., and Baumann, H. (1990) Inducible and tissue specific expression of rat α_1 -acid glycoprotein in transgenic mice. *J Immunol* 144:4392-4398
- Dinarello, C. A. (1984) Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *N Engl J Med* 311:1413-1418
- Dinarello, C. A. (1997) Cytokines as endogenous pyrogens. In: *Fever: basic mechanisms and management*. Mackowiak, P. A., ed.. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 87:116
- Dinarello, C. A. (1999) IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol* 103:11-24
- Dodds, A. W., and Law, S. K. A. (1998) The phylogeny and evolution of the thioester bond-containing proteins C3, C4 and α_2 -macroglobulin. *Immunol Rev* 166:15-26
- Doolittle, R. F. (1984) Fibrinogen and fibrin. *Annu Rev Biochem* 53:195-229
- Durand, G. (1989) Glycan variants of human α_1 -acid glycoprotein modulate the biology of macrophages. *Prog Clin Biol Res* 300:247-265
- Egger, B., Procaccino, F., Lakshmanan, J., Reinshagen, M., Hoffman, P., Patel, A., Reuben, W., Gnanakkan, S., Liu, L., Barajas, L., and Eysselein, V. (1997) Mice lacking transforming growth factor alpha have an increased susceptibility to dextran sulfate-induced colitis. *Gastroenterology* 113:825-832
- Egger, B., Buchler, M., Lakshmanan, J., Moore, P., Eysselein, V. (2000) Mice harboring a defective epidermal growth factor receptor (waved-2) have an increased susceptibility to acute dextran sulfate-induced colitis. *Scand J Gastroenterol* 35:1181-1187

- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981) Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156
- Ezekowitz, R. A. B., Day, L. E., and Herman, G. A. (1988) A human mannose-binding protein is an acute phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins. *J Exp Med* 167:1034-1046
- Fahracus, R. (1921) *Acta Med Scand* 55:1
- Fantuzzi, G., and Dinarello, C. A. (1996) The inflammatory response in interleukin-1 beat-deficient mice: comparison with other cytokine-related knock-out mice. *J Leukoc Biol* 59:489-493
- Flower, D. R. (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 318:1-14
- Fournier, T., Medjoubi-N, N., Monnet, D., Durand, G., and Porquet, D. (1994) Phenobarbital induction of alpha₁-acid glycoprotein in primary rat hepatocyte cultures. *Hepatology* 20:1584-1588
- Fournier, T., Medjoubi-N, N., and Porquet, D. (2000) Alpha-1 acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1482:157-171
- Fuse, E., Tanii, H., Kurata, N., Kobayashi, H., Shimada, Y., Tamura, T., Sasaki, Y., Tanigawara, Y., Lush, R. D., Headlee, D., Figg, W. D., Arbuck, S., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Akinaga, S., Kuwabara, T., Kobayashi, S. (1998) Unpredicted clinical pharmacology of UCN-01 caused by specific binding to human alpha₁-acid glycoprotein. *Cancer Res* 58:3248-3253
- Fuse, E., Tanii, H., Takai, K., Asanome, K., Kurata, N., Kobayashi, H., Kuwabara, T., Kobayashi, S., and Sugiyama, Y. (1999) Altered pharmacokinetics of a novel anticancer drug, UCN-01, caused by specific high affinity binding to α_1 -acid glycoprotein in humans. *Cancer Res* 59:1054-1060
- Gabay, C., and Kushner, I. (1999) Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340:448-454
- Gafvels, M. E., Coukos, G., Sayegh, R., Coutifaris, C., Strickland, D. K., and StraussIII, J. F. (1992) Regulated expression of the trophoblast α_2 -macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Differentiation and cAMP modulate protein and mRNA levels. *J Biol Chem* 267:21230-21234
- Galli-Taliadoros, L. A., Sedgwick, J. D., Wood, S. A., and Körner, H. (1995) Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice. *J Immunol Methods* 181:1-15
- Gambacorti-Passerini, C., Barni, R., le Coutre, P., Zucchetti, M., Cabrita, G., Cleris, L., Rossi, F., Gianazza, E., Brueggen, J., Cozens, R., Pioltelli, P., Pogliani, E., Corneo, G., Formelli, F., and D'Incalci, M. (2000) Role of alpha₁ acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst* 92:1641-1650
- Garber, T. R., Gonias, S. L., and Webb, D. J. (2000) Interleukin-4 and IL-10 bind covalently to activated human alpha₂-macroglobulin by a mechanism that requires Cys949. *J Interferon Cytokine Res* 20:125-131
- Gauldie, J. (1991) in: *Encyclopedia of human biology*, (Vol. 1). Dulbecco, R. ed. Academic Press, pp. 25-35
- Geiger, T., Andus, T., Kunz, D., Heiseg, M., Bauer, J., Nothoff, N., Gauthier, F., Tran-Thi, T. A., and Heinrich, P. (1988) Regulation of proteinase activity by high molecular weight inhibitors: biosynthesis of rat α -macroglobulins. *Adv Exp Med Biol* 240:183-189
- Gershenwald, J. E., Fong, Y. M., Fahey, T. J., Calvano, S. E., Chizzonite, R., Killian, F. L., Lowry, S. F., and Moldawer, L. L. (1990) Interleukin 1 receptor blockade attenuates the host inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4966-4970

- Gisselbrecht, S. (1999) The CIS/SOCS proteins: a family of cytokine-inducible regulators of signaling. *Eur Cytokine Netw* 10:463-470
- Glibetic, M. D., and Baumann, H. (1986) Influence of chronic inflammation on the level of mRNAs for acute phase reactants in the mouse liver. *J Immunol* 137:1616-1622
- Gonias, S. L., Carmichael, A., Mettenburg, J. M., Roadcap, D. W., Irvin, W. P., and Webb, D. J. (2000) Identical or overlapping sequences in the primary structure of human alpha(2)-macroglobulin are responsible for the binding of nerve growth factor-beta, platelet-derived growth factor-BB, and transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 275:5826-5831
- Gutteridge, J. M., and Smith, A. (1988) Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. *Biochem J* 256:861-865
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1990) The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280:1-8
- Hans, W., Schommerich, J., Gross, V., and Falk, W. (2000) The role of resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12:267-273
- Hansen, J. E. S., Jensen, S. P., Norgaard-Pedersen, B., and Bog-Hansen, T. C. (1986) Electrophoretic analysis of the glycan microheterogeneity of orosomucoid in cancer and inflammation. *Electrophoresis* 7:180-183
- Haraldsson, B., and Rippe, B. (1987) Orosomucoid as one of the serum components contributing to normal permselectivity in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 129:127-135
- Hardardottir, I., Grunfeld, C., and Feingold, K. R. (1994) Effects of endotoxin and cytokines on lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 5:207-215
- Hasty, P., Rivera-Perez, J., and Bradley, A. (1991) The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11:5586-5591
- Hasty, P., Abuin, A., and Bradley, A. (2000) Gene targeting, principles, and practice in mammalian cells. In: *Gene targeting: a practical approach*. Second edition. Joyner, ed. Oxford University Press Inc., New York, pp 1-35
- Havenaar, E. C., Hoff, R. C., Van den Eijnden, D. H., and van Dijk, W. (1998a) Sialyl Lewis(x) epitopes do not occur on acute phase proteins in mice: relationship to the absence of alpha₃-fucosyltransferase in the liver. *Glycoconj J* 15:389-395
- Havenaar, E. C., Axford, J. S., Brinkman-Van der Linden, E. C., Alavi, A., Van Ommen, E. C., van het Hof, B., Spector, T., Mackiewicz, A., and Van Dijk, W. (1998b) Severe rheumatoid arthritis prohibits the pregnancy-induced decrease in alpha₃-fucosylation of alpha1-acid glycoprotein. *Glycoconj J* 15:723-729
- Heegaard P. M. H. (1992) Changes in serum glycoprotein glycosylation during experimental inflammation in mice are general, unrelated to protein type, and opposite changes in man and rat: Studies on Mouse Serum alpha₁-acid glycoprotein, alpha₁-esterase, and alpha₁proteinase inhibitor. *Inflammation* 16:631-644
- Herve, F., Duche, J. C., d'Athis, P., Marche, C., Barre, J., and Tillement, J. P. (1996) Binding of disopyramide, methadone, dipyrnidole, chlorpromazine, lignocaine, and progesterone to the two main genetic variants of human alpha₁-acid glycoprotein: evidence for drug-binding differences between the variants and for the presence of two separate drug-binding sites on alpha₁-acid glycoprotein. *Pharmacogenetics* 6:403-415
- Herz, J., Clouthier, D. E., Hammer, R. E. (1992) LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* 71:411-421

- Herz, J., Clouthier, D. E., Hammer, R. E. (1993) Correction: LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* 73:428
- Hilliker, C., Overbergh, L., Van Leuven, F., and Van den Berghe, H. (1992) Assignment of mouse alpha-2-macroglobulin gene to chromosome 6 band F1-G3. *Mammal Genome* 3:469-471
- Holder, I. A., and Haidaris, C. G. (1979) Experimental studies of the pathogenesis of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: extracellular protease and elastase are in vivo virulence factors. *Can J Microbiol* 25:593-599
- Howard, J. B. (1981) Reactive site in human alpha₂-macroglobulin: circumstantial evidence for a thiolester. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2235-2239
- Howard, M., and O'Garra, A. (1992) Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today* 13:198-200
- Iijima, S., Shiba, K., Kimura, M., Nagai, K., and Iwai, T. (2000) Changes of alpha₁-acid glycoprotein microheterogeneity in acute inflammation stages analyzed by isoelectric focusing using serum obtained postoperatively. *Electrophoresis* 21:753-759
- Ikari, Y., Mulvihill, E., and Schwartz, S. M. (2001) α_1 -proteinase inhibitor, α_1 -antichymotrypsin, and α_2 -macroglobulin are the antiapoptotic factors of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 276:11798-11803
- Ikenaka, T., Ishiguro, M., Emura, J., Kaufmann, H., Isemura, S., Bauer, W., and Schmid, K. (1972) Isolation and partial characterization of the cyanogen bromide fragments of α_1 -acid glycoprotein and the elucidation of the amino acid sequence of the carboxyl-terminal cyanogen bromide fragment. *Biochemistry* 11:3817-3829
- Isaac, L., Florido, M. P., Fecchio, D., and Singer, L. M. (1999) Murine alpha-2-macroglobulin increase during inflammatory responses and tumor growth. *Inflamm Res* 48:446-452
- James, K. (1980) Alpha₂ macroglobulin and its possible importance in immune systems. *Trends Biochem Sci* 5:43-47
- James, K. (1990) Interactions between cytokines and α_2 -macroglobulin. *Immunol Today* 11:163-166
- Jamieson, J. C., Lammers, G., Janzen, R., and Woloski, B. M. (1987) The acute phase response to inflammation: the role of monokines in changes in liver glycoproteins and enzymes of glycoprotein metabolism. *Comp Biochem Physiol* 87:11-15
- Jensen, P. H., Moestrup, S. K., Sottrup-Jensen, L., Petersen, C. M., and Gliemann, J. (1988) Receptors for α_2 -macroglobulin and pregnancy zone protein-proteinase complexes in the human placental syncytiotrophoblast. *Placenta* 9:463-477
- Jezequel, M., Seta, N. S., Corbic, M. M., Feger, J. M., and Durand, G. M. (1988) Modifications of concanavalin A patterns of α_1 -acid glycoprotein and α_2 -HS glycoprotein in alcoholic liver disease. *Clin Chim Acta* 176:49-57
- Jiang, S.-L., Samols, C., Rzewnicki, D., Macintyre, S.S., Greber, I., Sipe, J., and Kushner, I. (1995) Kinetic modeling and mathematical analysis indicate that acute phase gene expression in Hep3B cells is regulated by both transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Clin Invest* 95:12453-1261
- Jolliet, R. P., Boukef, M. F., Duche, J. C., Simon, N., and Tillement, J. P. (1998) The genetic variant A of human alpha₁-acid glycoprotein limits the blood to brain transfer of drugs it binds. *Life Sci* 62:PL219-PL226
- Kaplan, M. H., and Volanakis, J. E. (1974) Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *J Immunol* 112:2135-2147

- Kawasaki, T., Etoh, R., and Yamashina, I. (1978) Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver. *Biochem Biophys Res Commun* 81:1018-1024
- Khan, M. M., Shibuya, Y., Nakagaki, T., Kambara, T., and Yamamoto, T. (1994) Alpha-2-macroglobulin as the major defence in acute pseudomonal septic shock in the guinea-pig model. *Int J Exp Pathol* 75:285-293
- Khan, M. M., Shibuya, Y., Kambara, T., and Yamamoto, T. (1995) Role of alpha-2-macroglobulin and bacterial elastase in guinea-pig pseudomonal septic shock. *Int J Exp Pathol* 76:21-28
- Kjeldsen, J., Lauritsen, K., and Schaffalitzky De Muckadell, O. B. (1997) Serum concentrations of orosomucoid: improved decision-making for tapering prednisolone therapy in patients with active inflammatory bowel disease? *Scand J Gastroenterol* 32:933-941
- Klein, E. S., DiLorenzo, D., Posseckert, G., Beato, M., and Ringold, G. M. (1988) Sequences downstream of the glucocorticoid regulatory element mediate cycloheximide inhibition of steroid induced expression from the rat alpha₁-acid glycoprotein promoter: evidence for a labile transcription factor. *Mol Endocrinol* 2:1343-1351
- Kluger, M. J., Kozak, W., Conn, C. A., Leon, L. R., and Soszynski, D. (1997) The adaptive value of fever. In: *Fever: basis mechanisms and management*, 2nd ed.. Mackowiak, P. A., ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp. 255-266
- Kodicek, M., Infanzon, A., and Karpenko, V. (1995) Heat denaturation of human orosomucoid in water/methanol mixtures. *Biochim Biophys Acta* 1246:10-16
- Koj, A., Guzdek, A., Nakamura, T., and Kordula, T. (1995) Hepatocyte growth factor and retinoic acid exert opposite effects on synthesis of type 1 and type 2 acute phase proteins in rat hepatoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 27:39-46
- Konstantinos, A., Papadakis, M. D., and Targan, S. R. (1999) Current theories on the causes of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 28:283-296
- Koo, P. H., and Stach, R. W. (1989) Interaction of nerve growth factor with murine alpha-macroglobulin. *J Neurosci Res* 22:247-261
- Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H., and Köhler, G. (1994) Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368:339-342
- Kotler, D. P. (2000) Cachexia. *Ann Intern Med* 133:622-634
- Kottgen, E., Hell, B., Kage, A., and Tauber, R. (1992) Lectin specificity and binding characteristics of human C-reactive protein. *J Immunol* 149:445-453
- Krauer, B., Dayer, P., and Anner, R. (1984) Changes in serum albumin and alpha₁-acid glycoprotein concentrations during pregnancy and analysis of fetal-maternal pairs. *Br J Obstet Gynaecol* 91:875-881
- Kremer, J. M. H., Wilting, J., and Janssen, L. H. M. (1988) Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol Rev* 40:1-47
- Kreuzpaintner, G., Horstkotte, D., Heyll, A., Losse, B., and Strohmeyer, G. (1992) Increased risk of bacterial endocarditis in inflammatory bowel disease. *Am. J. Med.* 92:391-395
- Kuehn, M., Bradley, A., Robertson, E. J., and Evans, M. J. (1987) A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through the introduction of HPRT mutations in mice. *Nature* 326:295-298
- Kühn, R., and Schwenk, F. (1997) Advances in gene targeting methods. *Curr Opin in Immunol* 9:183-188

- Kurdowska, A., Carr, F. K., Stevens, M. D., Baughman, R. P., and Martin, T. R. (1997) Studies on the interaction of IL-8 with human plasma α_2 -macroglobulin. *J Immunol* 158:1930-1940
- Kushner, I. (1982) The phenomenon of the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci* 389:39-48
- Kushner, I., and Mackiewicz, A. (1987) Acute phase proteins as disease markers. *Dis Markers* 5:1-11
- Kushner, I. (1988) The acute phase response: an overview. *Methods Enzymol* 163:373-383
- Kushner, I., and Mackiewicz, A. (1993) The acute phase response: an overview. In: *Acute phase proteins: molecular biology, biochemistry and clinical applications*. Mackiewicz, A., Kushner, I., and Baumann, H., eds. CRC Press, Boca Raton, pp. 3-19
- Kushner, I. (1993) Regulation of the acute phase response by cytokines. *Perspect Biol med* 36:611-622
- Lange, S., Delbro, D., Jennische, E., and Mattsby-Baltzer, I. (1996) The role of the Lps gene in experimental ulcerative colitis in mice. *APMIS* 104:823-833
- Lasky, L. A. (1995) Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem* 64:113-139
- Lauer, D., Reichenbach, A., and Birkenmeier, G. (1996) α_2 -macroglobulin-mediated degradation of amyloid β 1-42: a mechanism to enhance amyloid β catabolism. *Exp Neurol* 167:385-392
- Lee, S. C., Chang, C. J., Lee, Y. M., Lei, H. Y., Lai, M. Y., and Chen, D. S. (1989) Molecular cloning of cDNAs corresponding to two genes of α_1 -acid glycoprotein and characterization of two alleles of AGP-1 in the mouse. *DNA* 8:245-251
- Lee, Y. M., Tsai, W. H., Lai, M. Y., Chen, D. S., and Lee, S. C. (1993) Induction of liver alpha-1 acid glycoprotein gene expression involves both positive and negative transcription factors. *Mol Cell Biol* 13:432-442
- Lee, Y. M., and Lee, S. C. (1994) Transcriptional activation of the alpha-1 acid glycoprotein gene by YY1 is mediated by its functional interaction with a negative transcription factor. *DNA Cell Biol* 13:1029-1036
- Lee, Y. M., Miao, L. H., Chang, C. J., and Lee, S. C. (1996) Transcriptional induction of the alpha-1 acid glycoprotein (AGP) gene by synergistic interaction of two alternative activator forms of AGP/enhancer-binding protein (C/EBPbeta) and NF-kappaB or Nopp140. *Mol Cell Biol* 16:4257-4263
- Lentsch, A. B., Shanley, T. P., Sarma, V., and Ward, P. A. (1997) In vivo suppression of NF-KB and preservation of IKB α by interleukin-10 and interleukin-13. *J Clin Invest* 100:2443-2448.
- Lentsch, A. B., and Ward, P. A. (2000) Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathology* 190:343-348
- Li, Z.-W., Stark, G., Götz, J., Rülcke, T., Müller, U., and Weissmann, C. (1996) Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 93:6158-6162
- Li, X., Sumi, T., Matsukawa, T., Nakanishi, Y., and Ohba, Y. (1998) Thyroid hormone, all-trans retinoic acid, and 9-cis retinoic acid functioned as negative modulators of the effect of glucocorticoid on induction of alpha $_1$ -acid glycoprotein mRNA in RLN-10 cells. *Biochem Mol Biol Int* 45:1-10
- Liao, Y. C., Taylor, J. M., Vinnice, J. L., Clawson, G. A., and Sinchler, E. A. (1985) Structure of the rat alpha $_1$ -acid glycoprotein gene. *Mol Cell Biol* 5:12826-12831

- Lipscomb, M. F., Alvarellos, T., Toews, G. B., Tompkins, R., Evans, Z., Koo, G., and Kumar, V. (1987) Role of natural killer cells in resistance to *Cryptococcus neoformans* infections in mice. *Am J Pathol* 128:354-361
- Lögdberg, L., and Wester, L. (2000) Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. *Biochim Biophys Acta* 1482:284-297
- Longley, D. B., Steel, D. M., and Whitehead, A. S. (1999) Posttranscriptional regulation of acute phase serum amyloid A2 expression by the 5'- and 3'-untranslated regions of its mRNA. *J Immunol* 163:4537-4545
- Lubega, J., and Davies, T. J. (1990) A comparison of serum mucoprotein with serum alpha₁ acid glycoprotein, haptoglobin, and alpha₁ antitrypsin assays in monitoring inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta* 188:59-69
- Lysiak, J. J., Hussaini, I. M., Webb, D. J., Glass, W. F. 2nd, Allietta, M., and Goni, S. L. (1995) Alpha₂-macroglobulin functions as a cytokine carrier to induce nitric oxide synthesis and cause nitric oxide-dependent cytotoxicity in the RAW 264.7 macrophage cell line. *J Biol Chem* 270:21919-21927
- Ma, Y., Uemura, K., Oka, S., Kozutsumi, Y., Kawasaki, N., and Kawasaki, T. (1999) Anti-tumor activity of mannan-binding protein in vivo as revealed by a virus expression system: mannan-binding protein-dependent cell-mediated cytotoxicity (MDCC) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:371-375
- Mackiewicz, A., Ganapathi, M. K., and Kushner, I. (1987) Monokines regulate glycosylation of acute-phase proteins. *J Exp Med* 166:253-258
- Mackiewicz, A., Marcinkowska-Pieta, R., Ballou, S., Mackiewicz, S., and Kushner, I. (1987) Microheterogeneity of alpha₁-acid glycoprotein in the detection of intercurrent infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 30:513-518
- Mackiewicz, A., Pawlowski, T., Mackiewicz-Pawlowska, A., Wiktorowicz, K., and Mackiewicz, S. (1987) Microheterogeneity forms of alpha₁-acid glycoprotein as indicators of rheumatoid arthritis activity. *Clin Chim Acta* 163:185-190
- Mackiewicz, A., and Kushner, I. (1989) Interferon beta2/B-cell stimulating factor2/interleukin 6 affects glycosylation of acute phase proteins in human hepatoma cell lines. *Scand J Immunol* 29:265-271
- Mackiewicz, A., and Kushner, I. (1990) Transforming growth factor beta1 influences glycosylation of alpha₁-protease inhibitor in human hepatoma cell lines. *Inflammation* 14:485-487
- Mackiewicz, A., Speroff, T., Ganapathi, M. K., and Kushner, I. (1991) Effects of cytokine combinations on acute phase protein production in two human hepatoma cell lines. *J Immunol* 146:3032-3037
- Mackiewicz, A., Pawlowski, T., Gorny, A., and Kushner, I. (1992) Glycoforms of alpha₁-acid glycoprotein in the management of rheumatic patients. In: *Affinity Electrophoresis: Principles and application*. Breborowicz, J., and Mackiewicz, A., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 229
- Mackiewicz, A., Pos, O., Van der Stelt, M. E., Yap, S.-H., Karcinska, M., Laciak, M., Dewey, M. J., Berger, F. G., Baumann, H., Kushner, I., and Van Dijk, W. (1992) Regulation of glycosylation of acute phase proteins by cytokines in vitro. In: *Affinity Electrophoresis: Principles and application*. Breborowicz, J., and Mackiewicz, A., eds. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 135
- Mackiewicz, A., Lacik, M., Gorny, A., and Baumann, H. (1993) Leukemia inhibitory factor, interferon gamma, and dexamethasone regulate N-glycosylation of alpha₁-protease inhibitor. *Eur J Cell Biol* 60:331-336
- Maeda, H., and Molla, A. (1989) Pathogenic potentials of bacterial proteases. *Clin Chim Acta* 185:357-367

- Maes, M., Delange, J., Ranjan, R., Meltzer, H.Y., Desnyder, R., Cooremans, W., and Scharpe, S. (1997) Acute phase proteins in schizofrenia, mania and major depression: modulation by psychotropic drugs. *Psychiatry Res* 66:1-11
- Mähler, M., Bristol, I. J., Sundberg, J. P., Churchill, G. A., Birkenmeier, E. H., Elson, C. O., and Leiter, E. H. (1999) Genetic analysis of susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Genomics* 55:147-156
- Malhotra, R., Lu, J., Holmskov, U., and Sim, R. B. (1994) Collectins, collectin receptors and the lectin pathway of complement activation. *Clin Exp Immunol* 97 (Suppl. 2):4-9
- Mammen, E. F. (1998) The haematological manifestations of sepsis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41 Supp A:17-24
- Mangan, D. F., Robertson, B., and Wahl, S. M. (1992) IL-4 enhances programmed cell death (apoptosis) in stimulated human monocytes. *J Immunol* 148:1812-1816
- Marchini, G., Berggren, V., Djilali-Merzoug, R., and Hanllon, L. O. (2000) The birth process initiates an acute phase reaction in the fetus-newborn infant. *Acta Pediatr* 89:1082-1086
- Marguerie, G. A., Ginsberg, M. H., and Plow, E. F. (1985) Fibrinogen and platelet function. *Adv Exp Med Biol* 192:41-54
- Marino, M. W., Dunn, A., Grail, D., Inglese, M., Noguchi, Y., Richards, E., Jungbluth, A., Wada, H., Moore, M., Williamson, B., Basu, S., Old, L. J. (1997) Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8093-8098
- Martin, G. R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7634-7636
- Mashimo, H., Wu, D., Podolsky, D., Fishman, M. (1996) Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 274:259-265
- Mastukawa, T., Kitagawa, M., Katayama, K., Nagai, Y., Hayashi, T., Yasuda, H., and Ohba, Y. (1996) The existence of thyroid hormone responsive element, TRE, was confirmed in the first intron of rat α_1 -acid glycoprotein gene. *J Biochem Tokyo* 119:934-939
- Matsushima, K., and Oppenheim, J. J. (1989) *Cytokine* 1:2-13
- McCarthy, J. E., and Kollmus, H. (1995) Cytoplasmic mRNA-protein interactions in eukaryotic gene expression. *Trends Biochem Sci* 20:191-197
- McCormick, D. J., and Atassi, M. Z. (1990) Hemoglobin binding with haptoglobin: delineation of the haptoglobin binding site on the alpha chain of human hemoglobin. *J Protein Chem* 9:735-742
- McEver, R. P. (1991) Leukocyte interactions mediated by selectins. *Thromb Haemost* 66:80-87
- McPherson, A., Friedman, M. L., and Halsall, H. B. (1984) Crystallization of α_1 -acid glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 124: 619-624
- McVey, J. H. (1994) Tissue factor pathway. *Baillieres Clin Haematol* 7:469-484
- Means, R. T. Jr. (1995) Pathogenesis of the anemia of chronic disease: a cytokine-mediated anemia. *Stem Cells* 13:32-37
- Medjoubi-N, N., Henriques, C., Bui, E., and Porquet, D. (1999) NF-kappaB is involved in the induction of the rat hepatic α_1 -acid glycoprotein gene by phenobarbital. *Biochem Biophys Res Commun* 254:93-99

- Medjoubi-N, N., Henriques, C., Bui, E., Durand, G., Lardeux, B., and Porquet, D. (1999) Growth hormone inhibits rat liver alpha-1-acid glycoprotein gene expression in vivo and in vitro. *Hepatology* 29:186-194
- Melton, D. W. (1994) Gene targeting in the mouse. *Bioessays* 16:633-638
- Merritt, C. M., and Board, P. G. (1988) Structure and characterisation of a duplicated human α_1 -acid glycoprotein gene. *Gene* 66:97-106
- Merritt, C. M., Easteal, S., and Board, P. G. (1990) Evolution of human α_1 -acid glycoprotein genes and surrounding Alu repeats. *Genomics* 6:659-665
- Meyer, T., Gabriel, H. H., Ratz, M., Muller, H. J., and Kindermann, W. (2001) Anaerobic exercise induces moderate acute phase response. *Med Sci Sports Exerc* 33:549-555
- Miau, L. H., Chang, C. J., Tsai, W. H., and Lee, S. C. (1997) Identification and characterization of a nucleolar phosphoprotein, Nopp140, as a transcription factor. *Mol Cell Biol* 17:703-711
- Misra, U. K., Chu, C. T., Gawdi, G., and Pizzo, S. V. (1994) Evidence for a second alpha₂-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 269:12541-12547
- Misra, U. K., and Pizzo, S. (1999) Upregulation of macrophage plasma membrane and nuclear phospholipase D activity on ligation of the α_2 -macroglobulin signaling receptor: involvement of heterotrimeric and monomeric G proteins. *Arch Biochem Biophys* 363:68-80
- Mombaerts, P., Clarke, A. R., Hooper, M. L., and Tonegawa, S. (1991) Creation of a large genomic deletion at the T-cell antigen receptor β -subunit locus in mouse embryonic stem cells by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci* 88:3084-3087
- Moore, D. F., Rosenfeld, M. R., Gribbon, P. M., Winlove, C. P., and Tsai, C. M. (1997) Alpha-1-acid (AAG, orosomucoid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. *Inflammation* 21:69-82
- Morell, A. G., Gregoriadis, G., Scheinberg, I. H., Hickman, J., and Ashwell, G. (1971) The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J Biol Chem* 246:1461-1467
- Mortensen, R. F., Osmand, A. P., Lint, T. F., and Gewurz, H. (1976) Interaction of C-reactive protein with lymphocytes and monocytes: complement dependent adherence and phagocytosis. *J Immunol* 117:774-781
- Muchitsch, E.-M., Teschner, W., Linnau, Y., and Pichler, L. (1996) In vivo effect of α_1 -acid glycoprotein on experimentally enhanced capillary permeability in guinea-pig skin. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 331:313-321
- Müller, U. (1999) Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech of Dev* 82:3-21
- Murphy, H. S., Warner, R. L., Bakopoulos, N., Dame, M. K., Varani, J., and Ward, P. A. (1998) Heterogeneity of vascular endothelial cells: differences in susceptibility to neutrophil-mediated injury. *Microvasc Res* 56:203-211
- Nacmias, B., Tedde, A., Cellini, E., Forleo, P., Orlacchio, A., Guarnieri, B. M., Petruzzi, C., D'Andrea, F., Serio, A., and Sorbi, S. (2001) Alpha₂-macroglobulin polymorphisms in italian sporadic and familial Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 299:9-12
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramownewerly, W., and Roder, J. C. (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8424-8428

- Nakamura, H., Yuasa, I., Umetsu, K., Nakagawa, M., Nanba, E., and Kimura, K. (2000) The rearrangement of the human α_1 -acid glycoprotein/orosomucoid gene: evidence for tandemly triplicated genes consisting of two AGP1 and one AGP2. *Biochem Biophys Res Commun* 276:779-784
- Nakao, H., Nishikawa, A., Karasuno, T., Nishiura, T., Iida, M., Kanayama, Y., Yonezawa, T., Tarui, S., and Taniguchi, N. (1990) Modulation of N-acetyl-glucosaminyltransferase III, IV and V activates an alteration of the surface oligosaccharide structure of a myeloma cell line by interleukin 6. *Biochem Biophys Res Commun* 172:1260-1266
- Ni, J., Chen, S.-F., and Hollander, D. (1996) Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut* 39:234-241
- Nishio, Y., Isshiki, H., Kishimoto, T., and Akira, S. (1993) A nuclear factor for interleukin-6 expression (NF-IL6) and the glucocorticoid receptor synergistically activate transcription of the rat α_1 -acid glycoprotein gene via direct protein-protein interaction. *Mol Cell Biol* 13:1854-1862
- Ohno, H., Goto, S., Taki, S., Shirasawa, T., Nakano, H., Miyatake, S., Aoe, T., Ishida, Y., Maeda, H., Shirai, T., Rajewski, K., and Saito, T. (1994) Targeted disruption of the CD3 η locus causes high lethality in mice: modulation of Oct-1 transcription on the opposite strand. *EMBO J* 13:1157-1165
- Ohta, M., Kawasaki, T. (1994) Complement-dependent cytotoxic activity of serum mannan-binding protein towards mammalian cells with surface-exposed high-mannose type glycans. *Glycoconj J* 11:304-308
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98:694-702
- Overberg, L., Torrekens, S., Van Leuven, F., and Van den Berghe, H. (1991) Molecular characterization of the murinoglobulins. *J Biol Chem* 266:16903-16910
- Overberg, L., Hilliker, C., Lorent, K., Van Leuven, F., and Van den Berghe, H. (1994) Identification of four genes coding for isoforms of murinoglobulin, the monomeric mouse α_2 -macroglobulin. *Genomics* 22:530-539
- Overberg, L., Lorent, K., Torrekens, S., Van Leuven, F., and Van den Berghe, H. (1995) Expression of mouse alpha-macroglobulins, lipoprotein receptor related protein, LDL receptor, apolipoprotein E, and lipoprotein lipase in pregnancy. *J Lipid Res* 36:1774-1786
- Parivar, K., Tolentino, L., Taylor, G., and Oie, S. (1992) Elimination of non-reactive and weakly reactive human α_1 -acid glycoprotein after induction of the acute phase response in rats. *J Pharm Pharmacol* 44:447-450
- Pawlowski, T., Mackiewicz, S. H., and Mackiewicz, A. (1989) Microheterogeneity of alpha $_1$ -acid glycoprotein in the detection of intercurrent infection in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 32:347-351
- Perlmutter, D. H., Travis, J., and Punsal, P. I. (1988) Elastase regulates the synthesis of its inhibitor, alpha $_1$ -proteinase inhibitor, and exaggerates the defect in homozygous PiZZ deficiency. *J Clin Invest* 81:1774-1780
- Persidis, A. (1999) Arthritis drug discovery. *Nat Biotechnol* 17: 726-727
- Pervaiz, S., and Brew, K. (1987) Homology and structure function correlations between α_1 -acid glycoprotein and serum retino binding protein and its relatives. *FASEB J* 1:209-214
- Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kündig, T. M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P. S., Krönke, M., and Mak, T. W. (1993) Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73:457-467

- Pham, C., Debra, M. M., Hug, B., Heusel, J. W., and Ley, T. J. (1996) Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13090-13095
- Pimpaneau, V., Midoux, G., Durand, P., De Baetselier, P., Monsigny, M., and Roche A. C. (1989) Endocytosis of α -1-acid glycoprotein variants and neoglycoproteins containing mannose derivatives by a mouse hybridoma cell-line (2C11-12). Comparison with mouse peritoneal macrophages. *Glycoconjugate J* 6:561-574
- Pos, O., Moshage, H. J., Yap, S. H., Schnieders, J. P.M., Aarden, L. A., Van Gool, J., Boers, W., Brugman, A. M., and Van Dijk, W. (1989) Effects of monocytic products, recombinant interleukin-1, and recombinant interleukin-6 on glycosylation of α -1-acid glycoprotein: studies with primary human hepatocyte cultures and rats. *Inflammation* 13:415-427
- Pos, O., Van der Stelt, M. E., Wolbink, G.-J., Nijsten, M. W. N., Van der Tempel, G. L., and Van Dijk, W. (1990) Changes in serum concentration and the glycosylation of human α -1-acid glycoprotein and α -1-protease inhibitor in severely burned persons: relation to interleukin-6 levels. *Clin Exp Immunol* 82:579-582
- Pous, C., Chauvelot-Moachon, L., Lecoustillier, M., and Durand, G. (1992) Recombinant human interleukin 1 beta and tumor necrosis factor affect glycosylation of serum α -1-acid glycoprotein in rats. *Inflammation* 16:197-203
- Predescu, D., Predescu, S., McQuistan, and Palade, G. E. (1998) Transcytosis of α -1-acid glycoprotein in the continuous microvascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci* 95:6175-6180
- Pritchett, T., and Paulson, J. C. (1989) Basis for the potent inhibition of influenza virus infection by equine and guinea pig α -2-macroglobulin. *J Biol Chem* 264:9850-9858
- Proudfoot N. J., (1986) Transcriptional interference and termination between duplicated alpha-globin gene constructs suggests a novel mechanism for gene regulation. *Nature* 322:562-566
- Prowse, K. R., and Baumann, H. (1990) Molecular characterization and acute phase expression of the multiple *Mus caroli* α -1-acid glycoprotein (AGP) genes: difference in glucocorticoid stimulation and regulatory elements between the rat and the mouse AGP genes. *J Biol Chem* 265:10201-10209
- Ray, A., LaForge, S., and Sehgal, P. B. (1990) On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion. *Mol Cell Biol* 10:5736-5746
- Ray, B. K., and Ray, A. (1991) Molecular cloning and nucleotide sequence of complementary DNA encoding rabbit α -1-acid glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 178:507-513
- Raynes, J. (1982) Variations in the relative proportions of microheterogeneous forms of plasma glycoproteins in pregnancy and disease. *Biomedicine* 36:77-86
- Read, R. C. (1998) Experimental therapies for sepsis directed against tumor necrosis factor. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41 Supp A:65-69
- Rebeck, G. W., Reiter, J. S., Strickland, D. K., and Hyman, B. T. (1993) Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11:575-580
- Reinke, R., and Feigelson, P. (1985) Rat α -1-acid glycoprotein gene sequence and regulation by glucocorticoids in transfected L-cells. *J Biol Chem* 260:4397-4403
- Ricca, G. A., and Taylor, J. M. (1981) Nucleotide sequence of rat α -1-acid glycoprotein messenger RNA. *J Biol Chem* 256:11199-11202
- Ricca, G. A., Hamilton, R. W., McLean, J. W., Conn, J. E., Kalinyak, J. M., and Taylor, J. M. (1981) Rat α -1-acid glycoprotein mRNA. Cloning of double-stranded cDNA and kinetics of induction of mRNA levels following acute inflammation. *J Biol Chem* 256:10362-10368

- Richards, C., Gauldie, J., and Baumann, H. (1991) Cytokine control of acute phase protein expression. *Eur Cytokine Net* 2:89-98
- Rogers, J. T., Bridges, K. R., Durmowicz, G. P., Glass, J., Auron, P. E., and Munro, H. N. (1990) Translational control during the acute phase response: ferritin synthesis in response to interleukin-1. *J Biol Chem* 265:14572-14578
- Rothe, J., Mackay, F., Bluethmann, H., Zinkernagel, R., and Lesslauer, W. (1995) Phenotypic analysis of TNFR1-deficient mice and characterization of TNFR1-deficient fibroblasts in vitro. *Circ Shock* 44:51-56
- Sacco, R. E., Hutto, D. L., Waters, W. R., Xiasong, L., Kehrl, M. E. Jr., Zuckermann, F. A., and Wannemuehler, M. J. (2000) Reduction in inflammation following blockade of CD18 or CD29 adhesive pathways during the acute phase of a spirochetal-induced colitis in mice. *Microb Pathog* 29:289-299
- Salvesen, G., and Engild, J. J. (1993) Proteinase inhibitors: an overview of their structure and possible function in the acute phase. In: *Acute phase proteins: molecular biology, biochemistry and clinical applications*. Mackiewicz, A., Kushner, I., and Baumann, H., eds. CRC Press, Boca Raton, pp. 117-147
- Savoldi, G., Fenaroli, A., Ferrari, F., Rigaud, G., Albertini, A., Di Lorenzo, D. (1997) The glucocorticoid receptor regulates the binding of C/EBPbeta on the alpha-1-acid glycoprotein promoter in vitro. *DNA Cell Biol* 16:1467-1476
- Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S. C., and Dinarello, C. A. (1990) Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75:40-47
- Schmid, K. (1950) Preparation and properties of an acid glycoprotein prepared from human plasma. *J Am Chem Soc* 72:2816
- Schmid, K. (1953) Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXIX. Separation from human plasma of polysaccharides, peptides and proteins of low molecular weight. Crystallization of an acid glycoprotein. *J Am Chem Soc* 75:60-68
- Schmid, K., Kaufman, H., Isemura, S., Bauer, F., Emura, J., Motoyoma, T., Ishiguro, M., and Nanno, S. (1973) Structure of α_1 -acid glycoprotein. The complete amino acid sequence, multiple amino acid substitutions, and homology with the immunoglobulins. *Biochemistry* 12:2711-2724
- Schmid, K. (1975) α_1 -acid glycoprotein. In: *The plasma proteins*, Putnam, F. W., ed., Academic Press, New York, pp. 183-288
- Schmid, K., Nimerg, R. B., Kimura, A., Yamaguchi, H., and Binette, J. P. (1977) The carbohydrate units of human plasma alpha₁-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 492:291-302
- Schmid, K., Mao, S. K. Y., Kimura, A., Hayashi, S., and Binette, J. P. (1980) Isolation and characterization of a serine-threonine-rich galactoglycoprotein from normal human plasma. *J Biol Chem* 185:3221-3226
- Schmid, K. (1989) Human plasma α_1 -acid glycoprotein - biochemical properties, the amino acid sequence and the structure of the carbohydrate moiety, variants and polymorphisms. In: *Alpha₁-acid glycoprotein: genetics, biochemistry, physiological functions and pharmacology*. Baumann, P., Eap, C. B., Müller, W. E., and Tillement, J. P., eds. Alan R. Liss, New York, pp. 7-22
- Schnitzer, J. E., and Pinney, E. (1992) Quantitation of specific binding to orosomucoid to cultured microvascular endothelium: role in capillary permeability. *Am J Physiol* 263:H48-H55
- Schreiber, G. (1987) Synthesis, processing, and secretion of plasma proteins by the liver and other organs and their regulation. In: *The plasma proteins*, Putnam, F. W., ed., Academic Press, New York, 293

- Scuderi, P., Dorr, R. T., Liddil, J. D., Finley, P. R., Meltzer, P., Raitano, A. B., and Rybski, J. (1989) Alpha-globulins suppress human leukocyte tumor necrosis factor secretion. *Eur J Immunol* 19:939-942
- Sebetan, I. M., Oshida, S., Yuasa, I., and Tie, J. (1997) Genetic polymorphisms of orosomucoid ORM1 and ORM2 in Egyptians, Sudanese, and Qataris: occurrence of two new alleles. *Hum Biol* 69:121-129
- Sevaljevic, L., Petrovic, M., and Bogojevic, D. (1994) Pretreatment with alpha₂-macroglobulin leads to recovery of rats exposed to a lethal scald. *Burns* 20:122-127
- Shiels, B. R., Northemann, W., Gehring, M. R., and Fey, G. H. (1987) Modified nuclear processing of alpha₁-acid glycoprotein RNA during inflammation. *J Biol Chem* 262:12826-12831
- Sottrup-Jensen, L. (1989) alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J Biol Chem* 264:11539-11542
- Stein, B. L., Lamoureux, E., Miller, M., Vasilevsky, C.-A., Julien, L., and Gordon, P. H. (2001) Glutaraldehyde-induced colitis. *Can J Surg* 44:113-116
- Steinmetz, M., Uematsu, Y., and Lindahl, K. F. (1987) Hotspots of homologous recombination in mammalian genomes. *TIG* 3:7-10
- Stone, R. (1994) Search for sepsis drugs goes on despite past failures. *Science* 264:365-367
- Strickland, D. K., Kounnas, S. E., Argraves, W. S. (1994) LDL receptor related protein (LRP): a multiligand receptor. *Fibrinolysis* 8:204-215
- Taylor, B. A., and Phillips, S. J. (1996) Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics* 34:389-398
- Te Riele, H., Maandag, E. R., and Berns, A. (1992) Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci* 89:5128-5132
- The American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 20:864-874
- Thijs, C. T., Groen, A. K., Hovens, M., Mok, K. S. (1999) Risk of gallstone disease is associated with serum levels of alpha-1-acid glycoprotein. *Epidemiology* 10:764-766
- Threadgill, D. W., Yee, D., Matin, A., Nadeau, J. H., and Magnuson, T. (1997) Genealogy of the 129 inbred strains: 129/SvJ is a contaminated inbred strain. *Mammalian Genome* 8:390-393
- Tilg, H., Vannier, E., Vachino, G., Dinarello, C. A., and Mier, J. W. (1993) Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 178:1629-1636
- Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M. B., Dinarello, C. A., and Mier, J. W. (1994) Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83:113-118
- Tilg, H., Dinarello, C. A., and Mier, J. W. (1997) IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today* 18:428-432
- Tillet, W. S., Francis, T. Jr. (1930) Serological reactions in pneumonia with non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med* 52:561-571.
- Toh, H., Hayashida, H., Kikuno, R., Yasunaga, T., and Miyata, T. (1985) Sequence similarity between EGF-receptor and alpha₁-acid glycoprotein. *Nature* 314:199

- Tooyama, I., Kawatama, T., Akiyama, H., Moestrup, S. K., Glieman, J., and McGeer, P. L. (1993) Immunohistochemical study of alpha₂-macroglobulin receptor in Alzheimer and control postmortem human brain. *Molec Chem Neuropath* 18:153-160
- Tosner, J., Krejsek, J., and Louda, B. (1988) Serum prealbumin, transferrin, and alpha₁-acid glycoprotein in patients with gynecological carcinomas. *Neoplasma* 35:403-411
- Tracey, K. J., Beutler, B., Lowry, S. F., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I. W., Hariri, R. J., Fahet III, T. J., Zentella, A., Albert, J. D., Shires, G. T., and Cerami, A. (1986) Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234:470-474
- Tracey, K. J., Fong, Y., Hesse, D. G., Manogue, K. R., Lee, A. T., Kuo, G. C., Lowry, S. F., and Cerami, A. (1987) Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 330:662-664
- Travis, J., and Salvesen, G. S. (1983) Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem* 52:655-709
- Treuheit, M. J., Costello, C. E., and Halsall, H. B. (1992) Analysis of the five glycosylation sites of human alpha₁-acid glycoprotein. *Biochem J* 283:105-112
- Tsai, W. C., Strieter, R. M., Milkowski, J. M., Bucknell, K. A., Burdick, M. D., Lira, S. A., and Standiford, T. J. (1998) Lung-specific transgenic expression of KC enhances resistance to *Klebsiella pneumoniae* in mice. *J Immunol* 161:2435-2440
- Turner, G. A. (1992) N-glycosylation of serum glycoproteins in disease and its investigation using lectins. *Clin Chim Acta* 208:149-171
- Umans, L., Serneels, L., Overbergh, L., Lorent, K., Van Leuven, F., and Van den Berghe, H. (1995) Targeted inactivation of the mouse alpha₂-macroglobulin gene. *J Biol Chem* 270:19778-19785
- Umans, L., Serneels, L., Overbergh, L., Stas, L., and Van Leuven, F. (1999) alpha₂-macroglobulin- and murinoglobulin-1-deficient mice: a mouse model for acute pancreatitis. *Am J Pathol* 155:983-993
- Urban, T., Hurbain, I., Urban, M., Clement, A., and Housset, B. (1995) Oxidants and antioxidants. Biological effects and therapeutic perspectives. *Ann Chir* 49:427-434
- Van Den Heuvel, M. M., Poland, D. C., De Graaff, C. S., Hoefsmit, E. C., Postmus, P. E., Beelen, R. H., and Van Dijk, W. (2000) The degree of branching of the glycans of alpha(1)-acid glycoprotein in asthma. A correlation with lung function and inflammatory parameters. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1972-1978
- Van der Meer, J. W. M. (1988) The effects of recombinant interleukin-1 and recombinant tumor necrosis factor on non-specific resistance to infection. *Biotherapy* 1:19-25
- Van der Meer, J. W. M., Helle, M., and Aarden, L. (1989) Comparison of the effects of recombinant interleukin 6 and recombinant interleukin 1 on nonspecific resistance to infection. *Eur J Immunol* 19:413-416
- van Dijk, W., Pos, O., Van der Stelt, M. E., Moshage, H. J., Yap, S. H., Dente, L., Baumann, P., and Eap, C. B. (1991) Inflammation-induced changes in expression and glycosylation of genetic variants of alpha₁-acid glycoprotein. Studies with human sera, primary cultures of human hepatocytes and transgenic mice. *Biochem J* 276:343-347
- van Dijk, W., and Mackiewicz, A. (1993) Control of glycosylation alterations of acute phase glycoproteins. In: *Acute phase proteins: molecular biology, biochemistry, and clinical applications*. Mackiewicz, A., Kushner, I., and Baumann, H., eds. CRC Press, Boca Raton, London, pp. 559-579
- van Dijk, W., Turner, G. A., and Mackiewicz, A. (1994) Changes in glycosylation of acute-phase proteins in health and disease: occurrence, regulation and function. *Glycosyl Dis* 1:5-14

- van Dijk, W., and Mackiewicz, A. (1995) Interleukin-6 type cytokine-induced changes in acute phase protein glycosylation. *Ann N Y Acad Sci* 762:319-330
- van Dijk, W., Havenaar, E. C., and Brinkman-Van der Linden, E. C. M. (1995) α_1 -acid glycoprotein (orosomucoid): pathophysiological changes in glycosylation in relation to its function. *Glycoconjugate J* 12:227-233
- van Gool, J., Boers, W., and De Nie, I. (1978) Inhibitory effect of rat α_2 macrofetoprotein (α mFP), an acute phase globulin, on galactosamine hepatitis. *Exp Mol Pathol* 29:228-240
- van Gool, J., Ladiges, N. C. J. J., and Boers, W. (1982) Inhibition of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis by α -macrofetoprotein, an acute phase reactant of the rat. *Inflammation* 6:127-135
- Van Leuven, F., Cassiman, J. J., and Van den Berghe, H. (1979) Demonstration of an α_2 Macroglobulin receptor in human fibroblasts, absent in tumor-derived cell lines. *J Biol Chem* 254:5155-5160
- Van Leuven, F., Cassiman, J. J., and Van den Berghe, H. (1980) Primary amines inhibit recycling of α_2 M receptors in fibroblasts. *Cell* 20:37-43
- Van Leuven, F. (1982) Human α_2 -macroglobulin: structure and function. *Trends Biochem Sci* 7:185-187
- Van Leuven, F., Torrekens, S., Overbergh, L., Lorent, K., De Strooper, B., and Van den Berghe, H. (1992) The primary structure of mouse α_2 -macroglobulin, deduced from protein sequencing of the isolated subunits and from molecular cloning of the cDNA. *Eur J Biochem* 210:319-327
- Van Oss, C., Gillman, C., Bronson, P., Border, J. (1974) Phagocytosis-inhibiting properties of human serum alpha-1 acid glycoprotein. *Immunol Commun* 3:321-328
- Van Vugt, H., van Gool, J., and de Ridder, L. (1986) Alpha₂ macroglobulin of the rat, an acute phase protein, mitigates the early course of endotoxin shock. *Br J Exp Pathol* 67:313-319
- Van't Wout, J. W., Van der Meer, J. W. M., Barza, M., and Dinarello, C. A. (1988) Protection of neutropenic mice from lethal *Candida albicans* infection by recombinant interleukin 1. *Eur J Immunol* 18:1143-1146
- Vincent, J.-L. (1998) Cardiovascular alterations in septic shock. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41 Supp A:9-15
- Vogels, M. T. E., Cantoni, L., Carelli, M., Sironi, M., Ghezzi, P., and Van der Meer, J. W. M. (1993) Role of acute-phase proteins in interleukin-1-induced nonspecific resistance to bacterial infections in mice. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 37:2527-2533
- Vogels, M. T., Mensink, E. J., Ye, K., Boerman, O. C., Verschueren, C. M., Dinarello, C. A., Van der Meer, J. W. (1994) Differential gene expression for IL-1 receptor antagonist, IL-1, and TNF receptors and IL-1 and TNF synthesis may explain IL-1 induced resistance to infection. *J Immunol* 153:5772-5780
- Volanakis, J. E. (1982) Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann N Y Acad Sci* 389:235-250
- Waldman, A. S., and Liskay, R. M. (1988) Dependence of intrachromosomal recombination in mammalian cells on uninterrupted homology. *Mol Cell Biol* 8:5350-5357
- Wang, P., Wu, P., Siegel, M. I., Egan, R. W., and Billah, M. M. (1995) Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 270:9558-9563

- Wang, M., Jeng, K. C., and Ping, L. I. (1999) Exogenous cytokine modulation or neutralization of interleukin-10 enhance survival in lipopolysaccharide-hyporesponsive C3H/HeJ mice with *Klebsiella* infection. *Immunology* 98:90-97
- Webb, D. J., Wen, J., Lysiak, J. J., Umans, L., Van Leuven, F., and Gonias, S. L. (1996) Murine alpha-macroglobulins demonstrate divergent activity as neutralizers of transforming growth factor-beta and as inducers of nitric oxide synthesis. A possible mechanism for endotoxin insensitivity of the alpha₂-macroglobulin gene knock-out mouse. *J Biol Chem* 271:24982-24988
- Weimer, H. E., Mehl, J. W., and Winzler, R. J. (1950) Studies on the mucoproteins of human plasma. V. Isolation and characterization of a homogeneous mucoprotein. *J Biol Chem* 185:561-568
- Weiss, P., and Ashwell, G. (1988) The asialoglycoprotein receptor: properties and modulation by ligand. In *Alpha₁-acid glycoprotein: genetics, Biochemistry, physiological functions, and pharmacology*, Baumann, P., Eap, C. B., Müller, W. E., and Tillement, J. P., eds. Alan R. Liss, New York, pp. 169
- Wollenberg, G. K., LaMarre, J., Rosendal, S., Gonias, S. L., and Hayes, M. A. (1991) Binding of tumor necrosis factor alpha to activated forms of human plasma alpha₂ macroglobulin. *Am J Pathol* 138:265-272
- Wright, J. P., Young, G. O., and Tigler-Wybrandi, N. (1987) Predictors of acute relapse of Crohn's disease. A laboratory and clinical study. *Dig Dis Sci* 32:164-170
- Wu, K. K., and Thiagarajan, P. (1996) Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med* 47:315-331
- Yang, T. H., Tsai, W. H., Lee, Y. M., Lei, H. Y., Lai, M. Y., Chen, D. S., Yeh, N. H., and Lee, S. C. (1994) Purification and characterization of nucleolin and its identification as a transcription repressor. *Mol Cell Biol* 14:6068-6074
- Yiangou, M., and Papaconstantinou, J. (1993) The differential induction of α_1 -acid glycoprotein and serum amyloid A genes by heavy metals. *Biochim Biophys Acta* 1174:123-132
- Yiangou, M., Paraskeva, E., Hsieh, C.-C., Markou, E., Victoratos, P., Scouras, Z., and Papaconstantinou, J. (1998) Induction of a subgroup of acute phase protein genes in mouse liver by hyperthermia. *Biochim Biophys Acta* 1396:191-206
- Yoshima, H., Matsumoto, A., Mizuochi, T., Kawasaki, T., and Kobata, A. (1981) Comparative study of the carbohydrate moieties of rat and human plasma alpha₁-acid glycoproteins. *J Biol Chem* 256:8476-8484
- Yost, R. L., and DeVane, C. L. (1985) Diurnal variation of α_1 -acid glycoprotein concentration in normal volunteers. *J Pharm Sci* 74:777-779
- Yuasa, I., Umetsu, K., Vogt, U., Nakamura, H., Nanba, E., Tamaki, N., and Irizawa, Y. (1997) Human orosomucoid polymorphisms: molecular basis of the three common ORM1 alleles, ORM1*F1, ORM1*F2, and ORM*S. *Hum Genet* 99:393-398
- Zhang, H., Hastly, P., and Bradley, A. (1994) Targeting frequency for deletion vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 14:2404-2410
- Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J. P. P., and Stewart, A. F. (1998) A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet* 20:123-128
- Zhang, X. Q., Schooley, R. T., and Gerber, J. G. (1999) The effect of increasing alpha₁-acid glycoprotein concentration on the antiviral efficacy of human immunodeficiency virus protease inhibitors. *J Infect Dis* 180:1833-1837
- Zhang, Y., Muyrers, J. P. P., Testa, G., and Stewart, A. F. (2000) DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nat Biot* 18:1314-1317

LIJST MET PUBLICATIES

Publicaties in tijdschriften met leescomissie

Libert, C., **Hochepped, T.**, Berger, F., Baumann, H., Fiers, W., and Brouckaert, P. (1998) High level constitutive expression of alpha₁-acid glycoprotein and lack of protection against tumor necrosis factor induced lethal shock in transgenic mice. *Transgenic Research* 7:429-435

Hochepped, T., Van Molle, W., Berger, F., Baumann, H., and Libert, C. (2000) Involvement of alpha₁-acid glycoprotein in nonspecific resistance to a lethal gram-negative infection. *J Biol Chem* 275:14903-14909

Van Molle, W., **Hochepped, T.**, Brouckaert, P., and Libert, C. (2000) The major acute phase protein, serum amyloid P component, in mice is not involved in endogenous resistance against tumor necrosis factor alpha-induced lethal hepatitis, shock and skin necrosis. *Infect Immun* 68:5026-5029

Hochepped, T., Ameloot, P., Brouckaert, P., Van Leuven, F., and Libert, C. (2000) Differential response of alpha₂-macroglobulin deficient mice in models of lethal TNF-induced inflammation. *Eur Cytok Network* 11:597-601

Wielockx, B., **Hochepped, T.**, Staelens, J., Van Molle, W., and Libert, C. (2001) Detection, characterization and purification of a murine liver factor, capable of desensitizing towards the lethal activity of tumor necrosis factor. *Cytokine*, in press

Hochepped, T., Wullaert, A., Berger, F., Baumann, H., Brouckaert, P., Steidler, L., and Libert, C. (2001) Overexpression of α_1 -Acid Glycoprotein in transgenic mice leads to sensitization to acute colitis. submitted for publication

Hochepped, T., Van Leuven, F., Brouckaert, P., and Libert, C. (2001) Mice lacking α_2 -macroglobulin show increased host defence against Gram-negative bacterial sepsis, but are more susceptible to endotoxic shock. submitted for publication

Hochepped, T., Brouckaert, P., and Libert, C. (2001) α_1 -Acid Glycoprotein: inflammatory and immunomodulating properties. submitted for publication

Abstracten

Hochepped, T., Brouckaert, P., and Libert, C. Investigation of the role of α_1 -acid glycoprotein in interleukin-1-induced desensitization to TNF/GaIN. Arch Physiol Biochem 106:B10, 1997

Van Molle, W., Libert, C., Everaerd, B., Grijalba, B., Gansemans, Y., Ameloot, P., Takahashi, N., Truong, M.-J., **Hochepped, T.**, Fiers, W., and Brouckaert, P. α_1 -Acid glycoprotein (AGP) inhibits TNF-specific apoptosis induction in hepatocytes, but not in hepatoma tumour cell lines. Meeting of the Belgian Association for Cancer Research. Liège (Belgium), January 25, 1997. In 'Abstracts', No. 64, 1997

Libert, C., Van Molle, W., **Hochepped, T.**, Ameloot, P., Everaerd, B., Gansemans, Y., Grijalba, B., Takahashi, N., Truong, M.-J., Fiers, W. and Brouckaert, P. Inhibition of tumor necrosis factor-induced liver toxicity and lethality by the acute phase proteins α_1 -acid glycoprotein and α_1 -antitrypsin. 4th International Congress on the Immune Consequences of Trauma, Shock and Sepsis. Mechanisms and Therapeutic Approaches. München (Germany), March 4-8, 1997. Shock 7, Suppl., 65, No. 256, 1997

Van Molle, W., Libert, C., **Hochepped, T.**, Wielockx, B., Grijalba, B., Ameloot, P., Everaerd, B., Takahashi, N., Fiers, W., and Brouckaert, P. The acute phase proteins α_1 -acid glycoprotein and α_1 -antitrypsin are inhibitors of TNF- but not anti-Fas-induced apoptosis of hepatocytes in mice. Arch Physiol Biochem 106:B20, 1998

Hochepped, T., Wielockx, B., Van Molle, W., Staelens, J., Brouckaert, P., and Libert, C. α_1 -acid glycoprotein protects against a lethal infection of *K. pneumoniae*. Arch Physiol Biochem 108:B7, 1999

Libert, C., Wielockx, B., Staelens, J., **Hochepped, T.**, Van Molle, W., Brouckaert, P. and Elliott, R. Mapping of TNF response loci in mice. Abstract. Molecular Genetics Meeting, EMBL-Heidelberg (Germany), September 1-5, 1999

Hochepped, T., Van de Wouwer, M., Wielockx, B., Staelens, J., Van Molle, W., Brouckaert, P., Berger, F., Baumann, H., and Libert, C. Anti- and pro-inflammatory properties of α_1 -acid glycoprotein, studied in rat α_1 -acid glycoprotein transgenic mice. Mouse Molecular Genetics Meeting, EMBL-Heidelberg (Germany), September 1-5, 1999

Libert, C., **Hochepped, T.**, Staelens, J., Van Molle, W., and Wielockx, B. A mouse molecular genetic study of the lethal response to TNF. Abstract. 5th World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis, München (Germany), February 29 - March 4, 2000

Van Molle, W., Wielockx, B., **Hochepped, T.**, Staelens, J., and Libert, C. Research into the endogenous protecting mechanism of desensitisation and tolerisation. Abstract. 8th International TNF congress, Trondheim (Norway), May 14-18, 2000

Hochepped, T., Wielockx, B., Staelens, J., Van Molle, W., Baumann, H., and Libert, C. Anti- and pro-inflammatory properties of alpha₁-acid glycoprotein: studies in rat alpha₁-AGP transgenic mice. Trans-Tech meeting, Karolinska Institutet Stockholm (Sweden), May 17-19, 2000

Libert, C., Van Molle, W., **Hochepped, T.**, Wielockx, B., and Staelens, J. Inhibition of TNF-induced lethal systemic inflammatory response syndrom by endogenous protective factors. 5th Winter Congress on Innate Immunity, St. Sorlin (France), January 16-19, 2001

Van Molle, W., **Hochepped, T.**, Wielockx, B., Staelens, J., and Libert, C. Identification of novel endogenous TNF protecting genes using macro-arrays for differential gene induction. 5th World Congress on Inflammation. Edinburgh (Scotland), September 22-26, 2001

Staelens, J., Wielockx, B., **Hochepped, T.**, Van Molle, J., Guénet, J.-L., Van Roy, F., and Libert, C. Mapping and cloning of TNF resistance genes in *Mus spretus*. 15th International Mouse Genome Conference. Edinburgh (Scotland), October 21-24, 2001