

# **Molekulare Analyse der IL-6/gp130 abhängigen Signalwege während der Leberregeneration**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-Biol. Torsten Wüstefeld**  
geboren am 02.06.1973 in Göttingen

**2002**

Die vorliegende Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. rer. nat. W. Müller betreut und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Ch. Trautwein im Zentrum für Innere Medizin in der Abteilung von Prof. Dr. med. Michael P. Manns für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, der Medizinischen Hochschule Hannover in der Zeit von September 1998 bis Mai 2002 angefertigt.

**Referent:** Prof. Dr. rer. nat. W. Müller

**Koreferent:** Prof. Dr. med. Ch. Trautwein

**Tag der Promotion:** 08. Mai 2002

## Zusammenfassung

Aufgrund von Vorarbeiten wurde angenommen, daß der IL-6/gp130 Signalweg für den Ablauf der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie eine zentrale Rolle einnimmt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Bedeutung der IL-6/gp130 Signalkaskaden für die Leberregeneration genauer charakterisiert werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine transgene Maus verwendet die hepatozyten-spezifisch den löslichen humanen IL-6 Rezeptor überexprimiert. Nach Stimulation mit humanem IL-6 kommt es zu einer Überstimulation der gp130-abhängigen Signalkaskaden in Hepatozyten. Dieser Mechanismus wurde genutzt, um den Einfluß einer Hyperstimulation gp130-abhängiger Signalwege auf den Verlauf der Leberregeneration zu untersuchen. Die verlängerte Aktivierung der gp130-abhängigen Signalwege nach partieller Hepatektomie resultierte in einer verzögerten und verringerten Regeneration der Leber. Während die Anzahl replizierender Hepatozyten verringert war (BrdU Assay, Zyklin A und E Expression), kam es zu einer vermehrten Expression von Zellzyklusinhibitoren (p21, p27). Diese Ergebnisse sprechen für einen dosisabhängigen Einfluß der IL-6 Stimulation auf die Leberregeneration, wobei eine IL-6 Hyperstimulation den Regenerationsvorgang hemmt.

Im zweiten Teil wurde der Ansatz des konditionalen Knockout Modells gewählt, um das zentrale Signalmolekül der IL-6 Familie gp130 induzierbar in der Leber zu deletieren. Nach gp130 Deletion ist die Stat3 Aktivierung und Induktion der Akut-Phase Reaktion in der Leber blockiert. Zusätzlich werden die Immediate Early Gene AP1 und NFkB deutlich verspätet aktiviert. Die gp130 Deletion hatte jedoch keinen Einfluß auf die Proliferation der Hepatozyten nach partieller Hepatektomie. Zusätzliche Array-Analysen ergaben ebenfalls keine Veränderung in der Expression Zellzyklus-relevanter Gene. Da der Induktion der Akut-Phase-Antwort in Hepatozyten eine protektive Wirkung zukommt, wurden die gp130 deletierten Tiere nach partieller Hepatektomie zusätzlich mit LPS behandelt. Dies hatte eine signifikant reduzierte Proliferation der Hepatozyten und eine erhöhte Sterblichkeit der Tiere zur Folge. Analoge Befunde konnten in IL-6 Knock out Tieren erhoben werden.

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit die Rolle IL-6/gp130-abhängiger Signalwege für die Leberregeneration genauer definiert werden. Die Befunde sprechen dafür, daß eine IL-6-Überstimulation die Zellzyklusprogression nach partieller Hepatektomie hemmt, während eine Deletion des gp130 Rezeptors erst relevant wird, wenn zusätzliche Faktoren, wie z.B. eine bakterielle Infektion einen Stress auf die regenerierende Leber ausüben. Daher scheint der IL-6/gp130-Signalweg vorwiegend eine protektive Rolle für den regenerierenden Hepatozyten während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie zu haben.

**Schlagworte:** Leberregeneration, gp130, konditionaler Knock out

## Summary

Depending on the work of other groups it was postulated that the IL-6/gp130 signal pathway is essential for normal liver regeneration after partial hepatectomy. The aim of this paper was to characterise more clearly the function of the IL-6/gp130 signal cascade for the liver regeneration.

In the first part of this work, a transgenic mouse overexpressing the soluble human IL-6 receptor in hepatocytes was used. After stimulation with human IL-6 a “hyperstimulation” of the gp130 dependent signal pathway was induced in hepatocytes. This system was used to investigate the influence of a hyperstimulation of gp130 dependent pathways on the course of liver regeneration. The prolonged activation of the gp130 dependent pathways after partial hepatectomy resulted in a delayed and reduced regeneration of the liver. Associated with the reduced number of replicating hepatocytes (BrdU assay, cyclin A and E expression), the expression of cell cycle inhibitors (p21, p27) was increased. These results indicate a concentration dependent influence of the IL-6 stimulation on the regeneration of the liver, thereby an IL-6 “hyperstimulation” inhibits the process of regeneration.

In the second part of this work a konditional knock out model was chosen. In this model the central signaling molecule of the IL-6 family gp130 was inducible deleted in the liver. After deletion of gp130 the activation of stat3 and the induction of the acute phase reaction in the liver was completely blocked. Additionally the induction of the immediate early genes AP1 and NFkB was delayed. The deletion of the gp130 molecule had no effect on the proliferation of hepatocytes after partial hepatectomy. Additional array analysis showed also no differences in the expression of cell cycle relevant genes. As the induction of the acute phase reaction in hepatocytes has a protective effect, after partial hepatectomy gp130 deleted animals were treated with LPS. This leads to a significant reduced proliferation of hepatocytes and to an increased mortality in these animals. Comparable results were obtained using IL-6 knock out animals.

In summary in this work the function of the IL-6/gp130 dependent signaling events for liver regeneration has been more preciescly defined. The results indicate that a IL-6 “hyperstimulation” hamper the cell cycle progression after partial hepatectomy. A deletion of the gp130 receptor shows only an effect when an additional factor like a bacterial infection induces “stress” on the regenerating liver. In conclusion the IL-6/gp130 signaling pathway seems to have a protective role for the regenerating hepatocyte during liver regeneration after partial hepatectomy.

**Keywords:** Liver-regeneration, gp130, konditional Knock out

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Aufbau und Funktion der Leber	1
1.2	Der Zellzyklus	2
1.3	Leberregeneration	6
1.4	Der gp80/gp130-Rezeptorkomplex	10
1.5	Die Akut-Phase-Antwort	17
1.6	Zielsetzung der Arbeit	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Verwendete Bakterienstämme	19
2.2	Medium für Bakterien	19
2.3	Verwendete Plasmide	19
2.4	Rekombinante Proteine	20
2.5	Chemikalien	21
2.6	Radiochemikalien	24
2.7	Molekulargewichtsmarker	25
2.7.1	DNA-Marker	25
2.7.2	Protein-Marker	25
2.8	Enzyme	25
2.9	Antikörper	25
2.10	Oligonukleotide	26
2.11	Sonstige Materialien	26
2.12	Geräte	27
2.13	2/3 Hepatektomie	27
2.14	Agarosegelelektrophorese	28
2.15	Gewinnung von nukleären Extrakten aus Gewebe	29
2.15.1	Isolation der Zellkerne	29
2.15.2	Gewinnung nukleärer Extrakte	29
2.15.3	Dialyse nukleärer Extrakte	30
2.15.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	31
2.15.4.1	Bradford-Assay	31

2.15.4.2	Spektralphotometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	31
2.16	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	32
2.17	Gelfärbung mit Coomassie-Brilliant Blue	33
2.18	Western Blot	33
2.19	Gel-Shift-Analyse (Gel-Retardation-Assay)	34
2.19.1	Herstellung der doppelsträngigen DNA-Sonde	35
2.19.2	Radioaktive Endmarkierung der doppelsträngigen DNA-Sonde	35
2.19.3	Durchführung der Gel-Shift-Analyse	36
2.20	Erk-Kinase-Assay	37
2.20.1	Immunpräzipitation und Kinasereaktion	37
2.21	ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)	38
2.22	Zell-Proliferations-Assay	39
2.22.1	Probengewinnung und Aufbereitung	39
2.22.2	DNA-Denaturierung	39
2.22.3	Zusätzliche Fixierung	40
2.22.4	BrdU-Nachweisreaktion	40
2.22.5	Hämalaun –Färbung	40
2.23	Transformation, Lagerung, Charakterisierung und Isolierung von Plasmid-DNA	41
2.23.1	Herstellung kompetenter Zellen	41
2.23.2	Transformation	41
2.23.3	Vermehrung von transformierten Bakterien	42
2.23.4	DNA-Maxipräparation	42
2.23.5	DNA-Minipräparation	43
2.23.6	Restriktionsverdau der Plasmide	43
2.23.7	Glycerolstock	44
2.24	Isolation von genomischer DNA aus Mäuseschwänzen	44
2.25	Isolation von genomischer DNA aus Mäuselebern	45
2.26	Alkalischer Southern-Blot	45
2.27	Polymerasekettenreaktion (PCR)	46
2.28	RNA Extraktion aus Gewebe	48
2.29	Bestimmung der RNA-Konzentration	48
2.30	Northern-Blot	49
2.31	RNA-Gelelektrophorese	49

2.32	SSC-Semidry-Blot	50
2.33	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	51
2.34	RNA-DNA Hybridisierung	51
2.35	Gen-array-Analyse	52
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
3	Einfluß von IL-6 und seiner Rezeptoren auf die Leberregeneration in der Maus	53
3.1	Wirkung der Hyperstimulation mit Interleukin 6 auf die Leberregeneration und den Zellzyklus nach partieller Hepatektomie in hsgp80 transgenen Mäusen	53
3.1.1	IL-6 induziert eine starke und persistierende Stat 3 Aktivierung in PEPCK/hsgp80 transgenen Mäusen	53
3.1.2	Bestimmung der hIL-6 und hsgp80 Serumkonzentrationen vor und nach partieller Hepatektomie	56
3.1.3	Eine IL-6 Stimulation in hsgp80 transgenen Tieren führt auch zu einer lang anhaltenden Stat3 Aktivierung nach partieller Hepatektomie	58
3.1.4	Die Stimulation mit hIL-6 führt zu einer Verzögerung und Reduzierung der Zellproliferation in hsgp80 transgenen Tieren nach PH.	60
3.1.5	Die Stimulation von hsgp80 transgenen Mäusen mit hIL-6 verzögert die Expression von Zyklin A und E nach PH	62
3.1.6	Die Stimulation mit hIL-6 in den hsgp80 transgenen Tieren führt zu einer verstärkten p21 Expression	63
3.2	Mx-Cre/gp130 loxP Mäuse:	66
3.2.1	Deletion des Exon 16 durch plpC in den gp130loxP/mx-Cre Mäusen	66
3.2.2	Die Aktivierung von Stat3 ist in den gp130loxP/Mx-Cre Mäusen blockiert	69
3.2.3	Die Aktivierung von Immediate early Genen ist in den konditionalen Knock out Tieren inhibiert	71

3.2.4	Nachweis der Zellproliferation in der Leber während der Regenerationsphase nach partieller Hepatektomie	73
3.2.5	Die Regulation der Zell Zyklus Marker Zyklin E und A ist in den gp130loxP(+)/Mx-Cre(+) verändert	76
3.2.6	Analyse der Genexpression in den Kontroll- und Knock out Tieren nach Stimulation mit IL-6 durch einen Gen Array	77
3.2.7	Die Aktivierung der Akut Phase ist in gp130(+)/Mx-Cre Mäusen blockiert	80
3.2.8	Sowohl gp130 als auch IL-6 Knock out Tiere sind nach partieller Hepatektomie gegenüber LPS hypersensitiv	83
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>86</b>
4.1	Die Hyperstimulation mit IL-6 inhibiert den Zellzyklusprogress nach partieller Hepatektomie in hsgp80 transgenen Mäusen	87
4.2	IL-6/gp130 abhängige Signalwege wirken protektiv während der Leberregeneration	93
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>125</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>128</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>129</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Funktion der Leber

Die Leber (Hepar) als Organ besitzt die einzigartige Fähigkeit, nach Gewebeverlust die Organmasse wieder herzustellen. Das Regenerationsvermögen der Leber scheint auch in der Antike bekannt gewesen zu sein, wenn man an die Prometheuslegende denkt. Prometheus, der den Göttern das Feuer stahl, um es den Menschen zu geben, wurde vom Göttervater Zeus dafür bestraft. Prometheus wurde an einen Felsen gekettet, und täglich wurde ein Teil seiner Leber von einem Adler verzehrt. Über Nacht regenerierte die Leber, so daß die Qualen am folgenden Tag wieder von vorne beginnen konnten.

Da die Leber unter vielen Aufgaben auch die Galle produziert, wird sie als die größte Drüse des Körpers (Gewicht ca. 1500 g beim Menschen) bezeichnet. Die Funktionen der Leber sind sehr vielfältig und für den Erhalt der Körperhomeostase essentiell. In der Leber werden aus einem großen Teil der im Darm resorbierten Grundstoffe körpereigene Substanzen, wie z.B. Glykogen, Proteine (Fibrinogen, Prothrombin, Serumeiweißkörper), Phosphatide, Cholesterin sowie Fett aufgebaut und teilweise, wie beim Glykogen dort gespeichert. Das Blut wird chemisch „entgiftet“. Über die Kupffer-Zellen übernimmt die Leber Teile der Aufgaben des retikuloendothelialen Systems. Das freiwerdende Billirubin, als Abbauprodukt des Häms, wird an Albumin gebunden, den Leberzellen zugeführt und von diesen größtenteils an Glucuronsäure gebunden, dadurch wasserlöslich gemacht und als Gallenfarbstoff ausgeschieden. Die Galle, von der täglich etwa 500 ml gebildet werden, enthält außerdem Salze der Gallensäure (oberflächenaktiv, emulgieren Fette, aktivieren Lipasen im Duodenum), Cholesterin und Mineralien. Während der Fötalzeit erfolgt die Blutbildung in der Leber. Diesen Aufgaben entsprechend gehen ca. 12 % des gesamten Sauerstoffs des arteriellen Blutes an die Leber, und die Temperatur des venösen Blutes, das die Leber verläßt, liegt über der allgemeinen Körpertemperatur.

Die Leber ist in geringem Umfang unter dem Zwerchfell angewachsen, größtenteils aber von Bauchfell überzogen. Sie ist über die Pfortader in das Blutsystem

eingeschaltet, zwischen Darm und Milz einerseits und unterer Hohlvene andererseits (ihre Kapillaren bilden ein venöses "Wundernetz", rete miraculum). Die straffe Leberkapsel, Tunica fibrosa (Glissonsche Kapsel) hält die Leber zusammen, erlaubt aber gleichzeitig erhebliche Organverformungen. Bindegewebe begleitet als Capsula fibrosa perivascularis die Gefäße ins Innere der Leber.

## 1.2 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus definiert den Zeitraum zwischen zwei Zellteilungen. In eukaryotischen Zellen wird die Zellzyklusprogression durch eine streng regulierte Abfolge von Ereignissen kontrolliert. Der Zellzyklus beinhaltet vier definierte Phasen: die G1, S, G2 und M Phase (Abb. 1). Nach der Mitose (M Phase), begeben sich die Tochterzellen in die G1 Phase, in der primär das Zellwachstum stattfindet. Während der G1 Phase reagiert die Zelle auf Wachstum-inhibierende oder mitogene Signale. Der G1 Phase folgt die S Phase, in der die DNA Replikation stattfindet. Auf die G1 Phase folgt unmittelbar die G2 Phase, während der die Integrität der DNA Replikation überprüft wird. Danach begibt sich die Zelle wieder in die M Phase und führt die Mitose und Zytokinese durch, um Tochterzellen zu produzieren. In Zellkultur können die Zellen den Zellzyklus nach Entzug von Serum- und Wachstumsfaktoren verlassen und in einen Ruhezustand, die so genannte G0 Phase, übergehen. In vivo befinden sich die Zellen normalerweise in der G0 Phase. Dieser Zustand ist durch geringe metabolische Aktivität und eine Sensitivität gegenüber Mitogenen charakterisiert.

Das Durchlaufen des Zellzyklus einer Zelle bedarf der Aktivität einer Familie von CDKs (Zykin abhängigen Kinasen, CDK). Die CDKs bestehen aus einer Familie von verwandten Serine-Threonin Kinasen, der cdk's 1 bis 9. Die Mitglieder dieser Kinasefamilie benötigen für ihre katalytische Aktivierung eine Assoziation mit Zyklinen (Sherr, 1994; Morgan, 1995). Unterschiedliche Zykline binden und aktivieren unterschiedliche cdk's. Für den Übergang von der G1 Phase in die S Phase muß das Retinoblastomprotein phosphoryliert werden (pRb). Diese Phosphorylierung wird primär durch die D-Typ Zykline (Zykline D1, D2 und D3) in Verbindung mit cdk4 oder cdk6 reguliert, aber auch durch die E-Typ Zykline (Zykin E1 und E2) in Verbindung

mit cdk2 (Dowdy et al., 1993; Ewen et al., 1993). Die Phosphorylierung von pRb setzt dann den Heterodimer E2F-DP1 frei (Kato et al., 1993; Pagano et al., 1992). Mitglieder der E2F Familie von Transkriptionsfaktoren können die Expression einer Reihe von Genen, die für den Progress durch die S Phase benötigt werden, aktivieren (Adams und Kaelin, 1995).

Das Durchlaufen der G1 und der Eintritt in die S Phase hängen von der Aktivität von cdk2 ab (Dulic et al., 1992; Koff et al., 1992; Lees et al., 1992; Parker et al., 1991). Während der späten G1 und der frühen S Phase phosphorylieren der Zyklin E1-cdk2 Komplex und der erst vor kurzem entdeckte Zyklin E2-cdk2 Komplex eine Reihe von Zielproteinen, die für den Beginn der S Phase wichtig sind (Lauper et al., 1998; Gudas et al., 1999; Zariwala et al., 1998). Das Zyklin D1 und die E-Typ Zykline sind essentiell für das Durchlaufen des den G1/S Phase-Übergangs. Dies konnte durch Versuche mit antagonistischen Antikörpern gezeigt werden. Durch Mikroinjektion von Anti-Zyklin D1 (Baldin et al., 1993), Anti-Zyklin E1 (Ohtsubo et al., 1995) oder Anti-Zyklin E2 (Gudas et al., 1999) Antikörpern konnte der G1/S Phaseübergang verhindert werden. Hingegen führt eine Überexpression von Zyklin D1 oder Zyklin E zu einer Verkürzung des G1/S Phase Intervalls (Resnitzky et al., 1994; Quelle et al., 1993; Ohtsubo et al., 1993). Die simultane Koexpression von beiden Zyklinen führt zu einer noch weiteren Verkürzung der G1 Phase, was auf unterschiedliche Zielmoleküle bei den beiden Zyklinen hindeutet (Resnitzky et al., 1995). Während der späten S Phase interagiert cdk2 vornehmlich mit Zyklin A. Die Aktivität des Zyklin A-cdk2 Komplex ist essentiell für den Eintritt und das Durchlaufen der S Phase (Pagano et al., 1992; Giordano et al., 1989). Der Durchtritt durch den finalen Zellzyklusrestriktionspunkt am G2/M Phase Übergang wird durch die Aktivität der cdk 1 in Verbindung mit Partnern aus der Zyklin B Familie kontrolliert (Abb. 1) (Murray, 1992; Morgan, 1995).

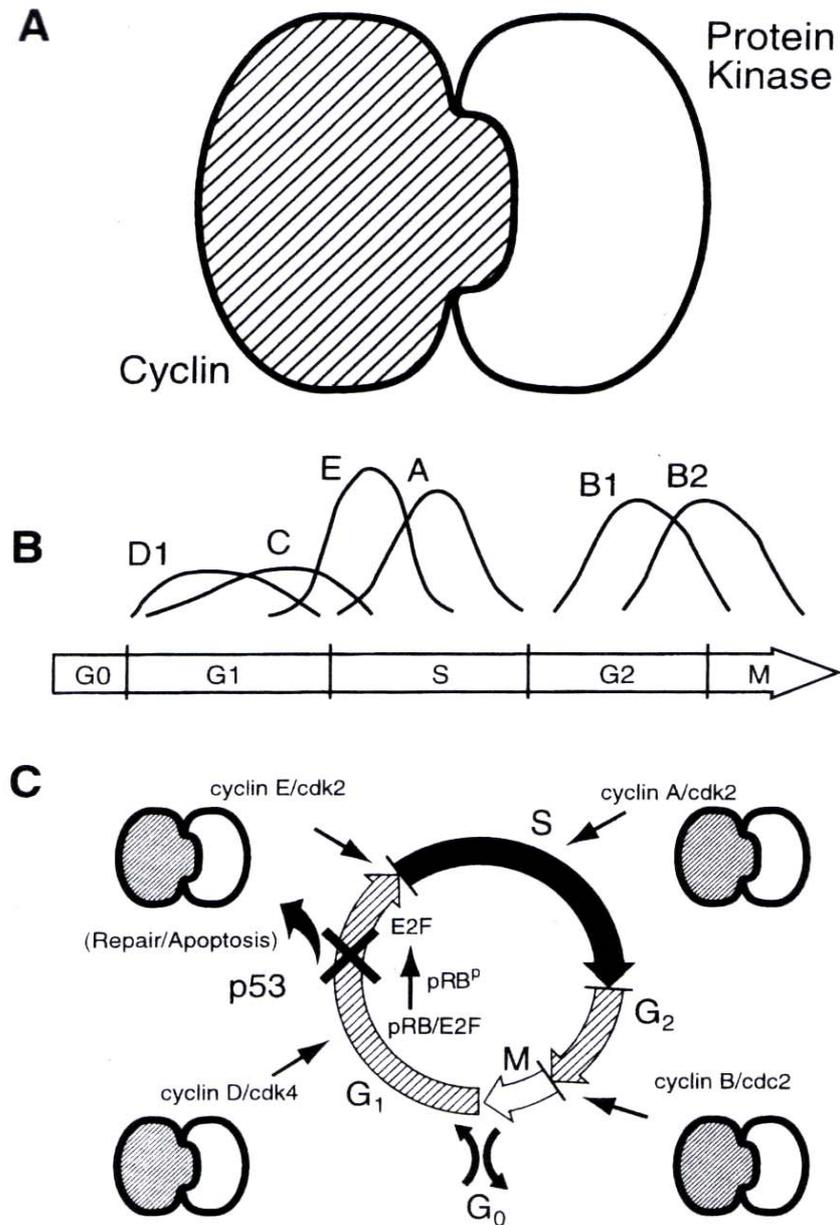


Abb. 1: Zellzyklusregulation (A) Das Durchlaufen durch den Zellzyklus wird durch Proteinkomplexe bestehend aus Zyklinen und Cdks reguliert. (B) Die zeitliche Expression von verschiedenen Zyklinen in Bezug auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus werden dargestellt. (C) Der p53 abhängige G1 Restriktionspunkt ist eingezeichnet (Abbildung nach Cordon-Cardo, 1995).

Die Aktivität der cdk Komplexe kann durch Proteine zweier Proteinfamilien inhibiert werden (CKI = cdk Inhibitoren). Die Ink4 Proteine führen zur Dissoziation von Zyklin D/CDK4 oder Zyklin D/CDK6 Komplexen (Quelle et al., 1995; Quelle et al., 1997; Pomerantz et al., 1998), während die p21 Proteinfamilienmitglieder unter bestimmten Umständen die CDK Aktivität inhibieren (LaBaer et al., 1997; Cheng et al., 1998). Zu der Ink4 Familie gehören  $p16^{Ink4a}$ ,  $p15^{Ink4b}$ ,  $p18^{Ink4c}$  und  $p19^{Ink4d}$ . Zusätzlich codiert der p16 Genlocus für ein weiteres als  $p19^{ARF}$  bezeichnetes Protein (im Menschen  $p14^{ARF}$ ) (Stott et al., 1998). Dieses Protein entsteht durch einen alternativen Leserahmen und besitzt CDK inhibitorische Aktivität. Im Fall von  $p19^{ARF}$  ist die Zellzyklus inhibierende Wirkung p53 abhängig (Pomerantz et al., 1998; Zhang et al., 1998).

Die p21 Familie besteht aus  $p21^{Cip1}$  ( $p21^{Waf1}$ ) (el-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993),  $p27^{Kip1}$  (Polyak et al., 1994; Toyoshima und Hunter, 1994) und  $p57^{Kip2}$  (Matsuoka et al., 1995; Lee et al., 1995). Die Mitglieder der p21 Proteinfamilie wirken sowohl als Inhibitoren der CDK Aktivität als auch als Komplexbildner (LaBaer et al., 1997; I. Reynisdottir und J. Massagué, 1995). Ergebnisse aus Untersuchungen an Knock out Mäusen deuten auf eine wichtige Stellung von p21 in der Zellzykluskontrolle hin (Deng et al., 1995). p21 inhibiert die Kinaseaktivität von CD<sub>1</sub>K, CDK2 und Cdc2, jedoch ist die Inhibition von CDK2 und Cdc2 p21 konzentrationsabhängig (Zhang et al., 1994). Außerdem wird die Inhibition von CD<sub>1</sub>K durch geringe Konzentrationen von p21 aufgehoben (Harper et al., 1995). p21 inhibiert den Zyklin B/Cdc2 Komplex nur sehr schwach. Als Komplexbildner unterstützen die p21 Familienmitglieder die Interaktion von CDK4 und D-Typ-Zyklinen. p21 unterstützt durch seine Interaktion mit PCNA auch die Koordination zwischen DNA Synthese und Zellzyklusprogression. PCNA ist eine aktive Untereinheit des DNA Polymerase  $\sigma$  Enzymkomplexes (Flores-Rozas et al., 1994). Die p21-Transkription wird durch das Tumorsupressorprotein p53 reguliert, und ist somit Komponente eines interaktivem System zwischen p53, CKIs und CDKs (Weinberg, 1995).

Knock out Mäuse für p27 zeigen Defekte im Gewebe- und Organwachstum, was auf eine Rolle von p27 bei der Kontrolle des Zellzyklus hindeutet (Fero et al., 1996; Nakayama et al., 1996). p27 inhibiert die Aktivität von Zyklin E/CDK2 Komplexen, ist

aber nicht eindeutig inhibitorisch für CD<sub>1</sub>K. Der Eintritt in die S-Phase scheint das Ablösen von p27 vom Zyklin E/CDK2 Komplex vorauszusetzen und es gibt Hinweise dafür, daß dieser Vorgang mit der Bindung von p27 an den CD<sub>1</sub>K Komplex einhergeht (Polyak et al., 1994; Polyak et al., 1994; Reynisdottir et al., 1995; Soos et al., 1996).

### **1.3 Leberregeneration**

Nach unterschiedlichen Formen der Leberschädigung kommt es zum Regenerieren der Leber. Im Tier ist das bekannteste und am besten charakterisierte Modell der Leberregeneration das der 2/3-Hepatektomie, das schon 1931 in der Ratte etabliert wurde (Higgins und Anderson, 1931).

Während des Regenerationsvorgangs können die Hepatozyten unverändert weiterhin alle ihre Funktionen wahrnehmen. Diese Funktionen beinhalten beispielsweise die Glukoseregulation, die Synthese vieler Serumproteine (eingeschlossen Albumin und Bestandteile der Blutgerinnung), Sekretion von Galle und den Abbau toxischer Substanzen. Der Vorgang der Leberregeneration kann daher nur durch eine komplexe Regulation verschiedener parallel ablaufender Vorgänge erfolgen.

In den ersten 30 Minuten nach 2/3-Hepatektomie werden eine Reihe von Genen induziert, welche mit dem Namen „immediate early genes“ bezeichnet werden. Diese Induktion ist unabhängig von neuer Proteinsynthese. Die IGFBP1-Expression, ein Plasmaprotein, das insulin-like growth factor I (IGF-1) und IGF-II bindet, erhöht sich um das 100fache (Mohn et al., 1990). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (signal transducer and aktivator of transcription-3) erfolgt innerhalb von 30 Minuten mit einer maximalen Aktivierung 3 Stunden nach Operation über einen Zeitraum von bis zu 5 Stunden (Cressman et al., 1995; Trautwein et al., 1996). Aktiviertes NFκB (p50-p65 Komplex) kann schon innerhalb von Minuten nach partieller Hepatektomie nachgewiesen werden (Cressman et al., 1994). NFκB und STAT3 werden sehr schnell nach Signalgebung aktiviert und translozieren in den Kern. Viele der "immediate early genes" besitzen Bindungssequenzen für diese beiden Proteine in ihren Promotorregionen. Als Ergebnis der Neusynthese von c-Fos

und c-Jun steigt die AP-1 Aktivität unmittelbar nach 2/3-Hepatektomie an. LRF-1, ein leuzin zipper Protein, wird schnell nach partieller Hepatektomie induziert und ist an der Komplexbildung mit c-Jun beteiligt (Hsu et al., 1991). Die unterschiedlichen Formen von AP-1 sind bis zu mehreren Stunden nach partieller Hepatektomie nachzuweisen (Taub, 1996). Die Aktivierung von STAT3, NF $\kappa$ B und AP-1 ist wahrscheinlich ein wichtiger Teil der intrazellulären Signalkaskade, die zur Aktivierung der DNA-Synthese führt. Die Expression des CCAAT/ enhancer-binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) verringert sich, während sich die von C/EBP $\beta$  erhöht (Trautwein et al. 1996), und die Expression anderer leberspezifischer Transkriptionsfaktoren wie HNF 1, HNF 4 oder HNF 3 unbeeinflusst bleibt.

Ähnliche Veränderungen im Muster der Transkriptionsfaktoren werden auch in Hepatozytenkulturen gesehen, die einer klonalen Expansion unterliegen (Block et al., 1996). In der regenerierenden Leber werden fötale Markergene wie beispielsweise alpha-Fetoprotein, Hexokinase und fetale Isoenzyme der Aldolase oder Pyrovatkinase exprimiert (Bonney et al., 1973; Walker und Potter, 1972). Andere Proteine die mit dem Zellzyklus im Zusammenhang stehen, darunter Enzyme der DNA Synthese (Thymidinkinase), Chromatinsynthese (Histon mRNAs), Zykline und Zyklin abhängige Kinasen (CDKs) (Loyer et al., 1994; Fausto et al., 1986) verhalten sich analog zu anderen proliferierenden Zellsystemen. Diese Veränderungen können in der Ratte während der ersten 5 bis 7 Tage nach Hepatektomie beobachtet werden. Danach ist der Regenerationsvorgang beendet und die ursprüngliche Lebermasse wieder hergestellt.

Nach partieller Hepatektomie begeben sich die verbleibenden Hepatozyten synchron in den Zellzyklus, nachdem sie die G<sub>0</sub>-Phase verlassen haben. Nach partieller Hepatektomie steigen die hepatischen TNF- $\alpha$  Konzentrationen sehr schnell an. Dieses Zytokin wird von biliären Epithelzellen und venösen Endothelzellen produziert. Die Kupffer Zellen scheinen nicht an der TNF- $\alpha$  Synthese beteiligt zu sein, wie durch in situ PCR Analysen gezeigt wurde. Experimente mit neutralisierenden anti-TNF $\alpha$  Antikörpern führten zu der Hypothese, daß dieses Zytokin von Bedeutung für die Leberregeneration ist (Diehl et al., 1994). Blockierungsexperimente führten zu einer Reduktion der JNK/SAPK Aktivität, der c-Jun Induktion und der AP-1 DNA-Bindungsaktivität. Dadurch konnte die zentrale

Bedeutung von TNF- $\alpha$  für die Aktivierung der Zellzyklusprogression nach partieller Hepatektomie gezeigt werden (Abb. 2). Interessanterweise induziert TNF- $\alpha$  in Folge die IL-6 Expression je nach den Bedingungen der partiellen Hepatektomie (Trautwein et al., 1996). Eine weitere Aufklärung der Funktion dieser Zytokine erfolgte durch die Nutzung von IL-6 und TNFR-1 Knock out Mäusen. Nach 2/3-Hepatektomien in IL-6 Knock out Mäusen kam es in diesen Mäusen zu Leberzellnekrosen und einem Leberversagen. Diese Veränderungen waren mit der Abwesenheit von Stat3 und der Inhibition der AP-1 Bindungsaktivität assoziiert (Cressmann et al., 1996). Die operierten IL-6 Knock out Tiere zeigten zusätzlich eine verringerte DNA-Synthese, eine verspätete Wiederherstellung der Lebermasse und eine erhöhte Sterblichkeitsrate. Der veränderte Phänotyp nach 2/3-Hepatektomie in IL-6<sup>-/-</sup> Tieren konnte durch IL-6 Gabe vollkommen revertiert werden. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen berichteten Sakamoto et al. (1999) von einer verringerten Apoptoserate und einem geringeren BrdU-Einbau-Index (entspricht verringerter Proliferation) in den IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen. Dieses führte zu einer verspäteten Wiederherstellung der Lebermasse, aber nicht zu einem signifikanten Unterschied in der Wiederherstellung der Lebermasse nach partieller Hepatektomie.

Weitere Hinweise für eine Rolle von IL-6 bei der Hepatozytenproliferation konnte durch Experimente mit doppeltransgenen Tieren gewonnen werden, die sowohl IL-6 als auch gp80 unter der Kontrolle von leberspezifischen Promotoren exprimierten. Diese Mäuse entwickelten hyperplastische Knoten, die humanen regenerativen hyperplastische Knoten ähnelten, Sie sind als eine Erkrankung beschrieben, die durch diffuse transformierte Mikroknoten aus hepatischem Parenchym und die Bildung von Leberadenomen charakterisiert ist (Maione D. et al., 1998; Schirmacher P. et al., 1998).

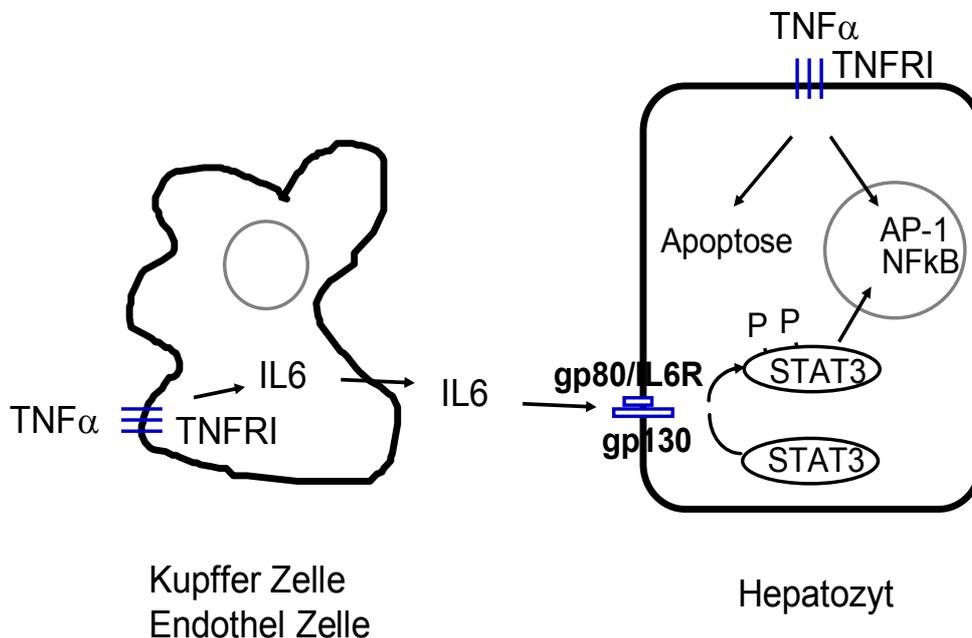


Abb. 2: Die Rolle von IL-6 in der Proliferation des Hepatozyten nach partieller Hepatektomie. Nach partieller Hepatektomie aktiviert  $TNF\alpha$  die IL-6 Expression in Kupfer Zellen und Endothel Zellen. IL-6 aktiviert über den  $gp80/gp130$  Rezeptorkomplex intrazelluläre Signalwege in den Leberzellen, die die Hepatozytenproliferation nach Hepatektomie triggern.

Die essentielle Rolle von IL-6 für die Leberregeneration wurde auch durch Untersuchungen an  $TNFR-1$  Knock out Mäusen festgestellt (Yamada Y., 1997). In diesen Mäusen war die  $NF\kappa B$  Aktivierung nach partieller Hepatektomie verzögert und es kam zu keiner Erhöhung der IL-6 Serumspiegel. Diese Experimente bestätigten die Hypothese, daß  $TNF-\alpha$  abhängige Effekte für die Aktivierung der IL-6 Expression verantwortlich sind, die wahrscheinlich in den Kupfer- oder den nicht parenchymatösen Zellen stattfinden. Als Ergebnis zeigen die  $TNFR-1$  Knock out Mäuse eine ähnlich veränderte Leberregeneration, wie  $IL-6^{-/-}$  Tiere. Analog zu  $IL-6^{-/-}$  Mäusen konnte in den  $TNFR-1$  Knock out Tieren der Phänotyp durch IL-6 Injektion aufgehoben werden (Yamada Y, 1997). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde ein

Modell entwickelt, in dem die Rolle von TNF- $\alpha$  und IL-6 während der Leberregeneration skizziert wurde. Die partielle Hepatektomie triggert primär erhöhte TNF- $\alpha$  Serumspiegel, dies aktiviert in den Kupferzellen NF $\kappa$ B und führt zur Sekretion von IL-6. Die IL-6-abhängigen Signalwege im Hepatozyten sind schließlich für die Zellzyklusprogression entscheidend.

#### **1.4 Der gp80/gp130-Rezeptorkomplex**

IL-6 ist ein Zytokin mit pleiotropen Funktionen im Immunsystem, in den hämatopoetischen Zellen, sowie in Hepatozyten und im Nervensystem (Akira et al., 1993; Bauer et al., 1991). Gp130 (CD130) gehört zur Zytokinrezeptor Klasse I Superfamilie und ist die gemeinsame signaltransduzierende Untereinheit von Zytokinen der IL-6-Familie, hierzu gehören IL-6, IL-11, leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatin M (OSM), ciliary neurotrophic factor (CNTF) und cardiotrophin-1 (CT-1) (Kishimoto et al., 1992; Kishimoto et al., 1994; Kishimoto et al., 1995; Taga 1997a; Taga 1997b). Gp130 wird nahezu ubiquitär exprimiert und besteht aus 918 Aminosäuren (AS). Es beinhaltet u.a. ein Signalpeptid von 22 Aminosäuren, einer Transmembrandomäne von 22 Aminosäuren sowie eine intracytoplasmatische Region, welche 277 Aminosäure umfaßt (Hibi et al., 1990; Saito et al., 1992). Die extrazelluläre Domäne besteht aus einer N-terminalen Immunoglobulinsuperfamilie C2-Domäne, gefolgt von einer Zytokinrezeptorsuperfamiliendomäne mit 4 konservierten Cysteinresten sowie aus vier Fibronectin Typ III Domänen, von denen nur die erste das für Zytokinrezeptoren charakteristische WSXWS-Motiv aufweist. Mittels Röntgenstrukturanalyse wurde die zytokinbindende Region von gp130 charakterisiert (Bravo et al., 1998). Während gp130 alleine nur OSM binden kann, wird durch Nutzung von anderen Zytokinrezeptoren dieser Familie die Ligandenbindungsaffinität stark erhöht (Gearing et al., 1992). Bei Primaten gibt es ein für gp130-kodierendes Gen und ein weiteres Pseudogen (Rodriguez et al., 1995), während Mäuse nur ein aus 18 Exons bestehendes Gen besitzen (Yoshida et al., 1996). Die mit gp130 assoziierten Zytokinrezeptoren können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe trägt zur Ligandenbindung, nicht aber zur Signaltransduktion bei. Die zweite Gruppe ist hingegen sowohl für die Ligandenbindung als auch die Signaltransduktion verantwortlich. Zu der ersten

Gruppe von Rezeptoren gehören gp80, IL-11Ra, CNTFRa und vermutlich CT-1R (Robledo et al., 1997). Die zweite Gruppe besteht aus LIFR und OSMR. Durch gp130 Homodimerisierung wird von den Zytokinen IL-6 (Abb. 3) und IL-11 nach Ligandenbindung die Signaltransduktion ausgelöst, hingegen erfolgt die Signalweiterleitung nach Heterodimerisierung von gp130 mit dem LIF-Rezeptor (LIFR) bei LIF, CNTF und CT-1.

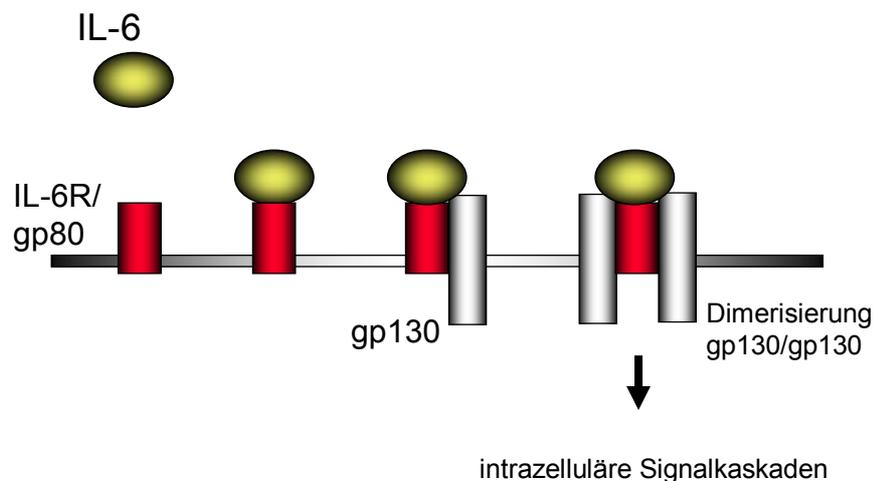


Abb. 3: IL-6 abhängige Signalvermittlung durch den IL-6/gp80/gp130-Komplex

Die Bindung von Liganden führt zur raschen Internalisierung, lysosomalem Abbau und einer Reduktion der Expression von Zelloberflächenrezeptoren (Coulie et al., 1989; Munck-Petersen et al., 1990; Dittrich et al., 1996; Graeve et al., 1996; Nesbitt et al., 1992; Zohlnhöfer et al., 1992; Thiel et al., 1998). Neben den membranständigen Varianten der gp130 assoziierten Zytokinrezeptoren kommen alle, auch als lösliche Form vor (Heaney and Golde, 1996; Diamant et al., 1997). Die löslichen Formen der Rezeptoren entstehen entweder durch alternatives Splicing oder durch posttranskriptionelle Modifikation mittels einer Protease (Müllberg et al., 1995). Durch die lösliche Variante des gp80-Rezeptors werden auch Zellen, die den membranständigen Rezeptor nicht exprimieren, sondern nur gp130 besitzen für IL-6 empfindlich (Mullberg et al., 1993). Dieses Phänomen wird auch als "Transsignaling" bezeichnet.

Verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden werden nach Homo- bzw. Heterodimerisierung von gp130 aktiviert (Abb. 4) (Taga und Kishimoto, 1997; Taga 1997). Gp130 selbst besitzt keine Kinaseaktivität, ist aber konstitutiv mit Kinasen der Janusfamilie assoziiert, welche im Bereich des Box1-Motivs nahe der Zellmembran an gp130 binden (Lütticken et al., 1994). Diese Tyrosinkinasen werden durch Dimerisierung von gp130 aktiviert, wobei es zu deren Autophosphorylierung und zur Phosphorylierung von Tyrosinen im zytoplasmatischen Bereich von gp130 kommt (Stahl et al., 1994). Bei diesem Vorgang wird beispielsweise das Tyrosin Y767 im Box3-Motiv phosphoryliert. An das phosphorylierte Tyrosin bindet Stat3 über seine SH2-Domäne und wird ebenfalls von den Januskinasen phosphoryliert (Stahl et al., 1995). Es folgt eine Freisetzung und anschließende Stat3-Homodimerisierung. Der dabei entstehende Stat3-Komplex transloziert in den Kern und bindet dort an GAS-Elemente. In geringerem Maße wird durch gp130 auch STAT1 aktiviert. STAT1 kann ebenfalls Homodimere bilden oder aber mit STAT3 heterodimerisieren. Die vier distalen Tyrosine des zytoplasmatischen Bereichs von gp130 (Y915, Y905, Y814, Y767) erlauben die Aktivierung von STAT3, wohingegen zur STAT1-Bindung nur die Tyrosine Y915 und Y905 fähig sind (Heinrich et al., 1998). Die volle Aktivität der STAT-Proteine kann erst durch eine zusätzliche Serinphosphorylierung nahe dem COOH-Terminus erreicht werden (Wen et al., 1995), die vermutlich von PI3K oder MAPK erfolgt.

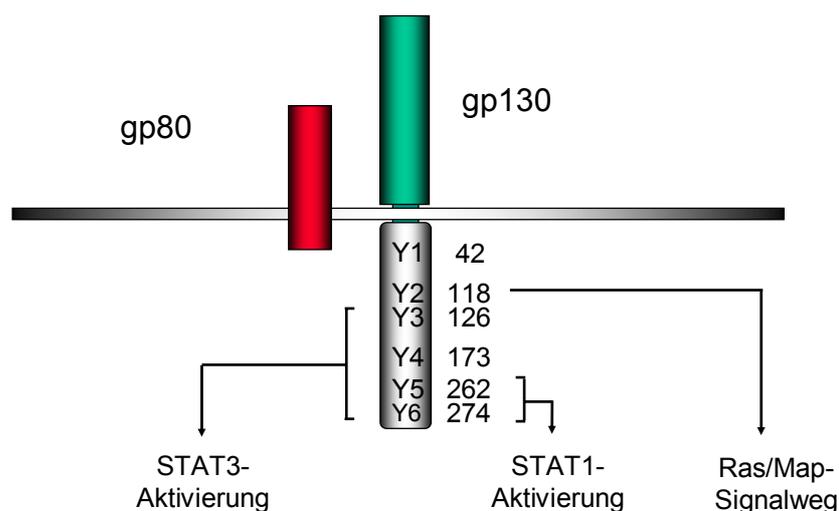


Abb. 4: Die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskaden des gp80/gp130-Komplex

Durch gp130 kann zusätzlich die RAS/MAPK-Kaskade aktiviert werden (Taga und Kishimoto, 1997; Taga, 1997). Essentiell für die Aktivierung dieses Signalweges ist die Aminosäure Y759 des gp130 Rezeptors (Fukada et al., 1996). Dieses Tyrosin wird von den Januskinasen phosphoryliert, woraufhin an die Aminosäure Y759 die Phosphatase SHP-2 und wahrscheinlich auch GRB2 und SOS bindet. Es folgt die Aktivierung von Ras durch den Übergang von der inaktiven Ras-GDP zur aktiven Ras-GTP Form (Fukada et al., 1996). Daraufhin kommt es zu einer Kaskade von Aktivierungen, wobei Ras-GTP die Serin/Threonin Kinase Raf aktiviert, die wiederum MAPKK (MEK) phosphoryliert. Die MAPKK besitzt Tyrosinkinase- und Serin/Threoninkinaseaktivität. Ihr Substrat ist die MAPK (ERK). ERK letztlich wandert in den Kern und phosphoryliert dort Transkriptionsfaktoren wie NF-IL6, TCF-Proteine oder c-Jun. Neben den aktivierenden Komponenten dieser Signaltransduktionskette sind auch inhibitorisch wirkende Faktoren bekannt. Gap-Proteine beispielsweise katalysieren die Umwandlung von aktivem RasGTP zu inaktivem RasGDP. STAT-abhängig werden SOCS1/SOCS2/SOCS3/CIS induziert, die die katalytische Aktivität der Januskinasen inhibieren (Starr et al., 1997). Ebenso kann phosphoryliertes STAT1 durch PIAS1 und analog STAT3 durch PIAS3 blockiert werden (Chung et al., 1997).

Die zur gp130-abhängigen Familie gehörenden Zytokine IL-6, IL-11, LIF, OSM, CNTF und CT-1 zeigen pleiotrophe und redundante Wirkungen (Kishimoto 1989, Kishimoto 1997, Taga 1997). So sind zum Beispiel alle 6 Mitglieder dieser Familie in der Lage, die Synthese von Akut-Phase-Proteinen (APP) in der Leber zu stimulieren.

IL-6 wird von einer Vielzahl von Zelltypen produziert. Dies schließt z.B. Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen, Keratinozyten, Knochenmarksstromazellen, B-Zellen, T-Zellen, Granulozyten, Astrozyten, Myozyten und Hepatozyten ein. Die Serumexpression von IL-6 korreliert mit der Schwere einer Infektion sowie im Mausmodell mit der Infektionsdosis. Bekannte Funktionen von IL-6 sind:

- Stimulation der Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen
- Wachstumsfaktor für Hybridoma/Plasmazytoma/Myeloma Zellen
- mitotische Kostimulanz für Thymozyten und periphere T-Zellen

- Induktion der Expression von IL-2 und IL-2R
- Unterstützung der Differenzierung zytotoxischer T-Zellen
- Verstärkung der Aktivität von NK-Zellen
- Stimulation der Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen
- Förderung der Bildung von Megakaryozyten
- Differenzierung von myeloiden Leukämiezelllinien zu Makrophagen
- Stimulation der Synthese von Akut Phase Proteinen in Hepatozyten
- Stimulation der Fiberinduktion
- Stimulation der Synthese von Adrenocorticotrophem Hormon (ACTH), Prolactin und Wachstumshormon (GH)
- Induktion des Enzyms Phospholipase A2 (Bedeutung für die Synthese von potenten inflammatorischen Molekülen wie Leukotrienen und Prostaglandinen)
- Stimulation der Bildung und Aktivität von Osteoklasten
- Stimulation von Endothelzellen zur Bildung von PDGF (regt die Proliferation von Myozyten der glatten Gefäßmuskulatur an)
- Unterstützung des Überlebens cholinergischer Neuronen und Oligodendrozyten
- Stimulation der hCG-Sekretion im Trophoblasten

Dysregulation der IL-6 Synthese tritt bei vielen Krankheiten auf wie z.B. am multiplen Myelom, rheumatoider Arthritis, Castleman's Krankheit und Osteoporose in der Postmenopause. Auch der humane Herpesvirus Typ 8 besitzt ein IL-6 Homolog (Burger et al., 1998).

Der IL-6R (gp80) wird in vielen Geweben exprimiert:

- T-Zellen
- aktivierte B-Zellen
- Plasmazellen
- Monozyten
- aktivierte Granulozyten
- hämatopoetische Zellen
- Fibroblasten
- Hepatozyten
- neuronale Zellen
- Muskelgewebe

- Lunge
- Niere

(Hirata et al., 1989; Taga et al., 1987; Coulie et al., 1989; Kobayashi et al., 1992; Wognum et al., 1993; Falus et al., 1994; Baroja et al., 1996; Tajima et al., 1996; Munck-Petersen et al., 1990; Zola und Flego 1992; Bauer et al., 1989; Ishiyama et al., 1996; McKinstry et al., 1994; Rincon et al., 1997; Wang et al., 1998).

Durch die Analyse von Knock out Mäusen konnten die wichtigsten und aussagekräftigsten Ergebnisse über die Funktion gp130-abhängiger Zytokine in vivo gezeigt werden. IL-6 defiziente Tiere (Kopf et al., 1995; Bluethmann et al., 1994; Ramsay und Kopf 1997; Poli 1997) zeigen eine Reihe von Defekten, die das Immunsystem betreffen. Die Anzahl von Thymozyten und peripheren T-Zellen ist in diesen Tieren um 30% reduziert (Kopf et al., 1994). Zusätzlich entwickeln sich die T-Helferzellen bevorzugt zu TH2-Zellen, wohingegen die Ausbildung von TH1-Zellen erschwert ist (Romani et al., 1996; Suzuki et al., 1997). IL-6-defiziente Mäuse wiesen ohne Immunisierung eine um 50% verringerte Anzahl von IgA Plasmazellen in Darm, Lunge und mesenterialen Lymphknoten auf (Ramsay et al., 1994). Außerdem sind die IL-6 Knock out Tiere sehr anfällig gegenüber Infektionen mit Viren, Bakterien, Pilzen und Protozoen (Kopf et al., 1994; Dalrymple et al., 1995; Romani et al., 1996; Suzuki et al., 1997). Darüber hinaus ist die Synthese von Chemokinen und die Akkumulation von Leukozyten an Entzündungsherden in den Knock out Mäusen gehemmt (Romano et al., 1997). Auch die Hämatopoese war in IL-6-defizienten Mäusen betroffen, wobei eine verzögerte hämatopoetische Resynthese nach induzierter Anämie sowie eine Disregulation der Anzahl hämatopoetischer Vorläuferzellen festzustellen war (Bernad et al., 1994). Des Weiteren traten Defekte des Nervensystems auf. So waren die IL-6-defizienten Tiere nicht mehr zur Fieberinduktion fähig (Chai et al., 1996). Zusätzlich war die Aktivierung von Gliazellen nach Neuronenschädigung inhibiert (Klein et al., 1997). Die Regenerationsfähigkeit der Leber nach partieller Hepatektomie war in IL-6-defizienten Mäusen stark eingeschränkt (Cressman et al., 1996), ebenso die Synthese von Akut Phase Proteinen nach subcutaner Terpinininjektion, nicht jedoch nach LPS-Applikation (Kopf et al., 1994; Fattori et al., 1994). Der normalerweise nach

Östrogen- oder Androgendepletion folgende Verlust an Knochensubstanz trat in IL-6-defizienten Tieren nicht auf (Poli et al., 1994; Bellido et al., 1995).

Gp130-defiziente Mäuse sind nicht lebensfähig. Sie sterben, je nach genetischem Hintergrund, zwischen Tag 12,5 p.c. und postnatal (Akira et al., 1995; Yoshida et al., 1996; Kawasaki et al., 1997; Yoshida et al., 1997) und weisen eine Wachstumsbeeinträchtigung auf. Beschrieben sind eine verringerte Zellularität der fötalen Leber und eine verminderte Anzahl hämatopoetischer Vorläufer. Jedoch war nur in ca. 20% aller gp130-defizienten Individuen eine Anämie zu finden. Die Tiere zeigten ähnlich dem LIFR-defizienten Tieren eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten sowie eine Verringerung der Knochenmasse. Weiterhin trat ab Tag 16.5 p.c. eine stark ausgeprägte Hypoplasie des Myocards auf. Außerdem war die Plazentaarchitektur und Permeabilität in gp-130-defizienten Tieren gestört und die Anzahl der Keimbahnzellen vermindert.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß in Tieren bei denen lediglich ein Mitglied der gp130 abhängigen Zytokinfamilie deletiert ist ein relativ moderater Phänotyp vorliegt. Das Fehlen des gp130 Rezeptor hingegen, resultiert in embryonaler oder postnataler Letalität.

Eine andere Möglichkeit die Wirkung eines Zytokins in vivo zu untersuchen, ist seine Überexpression mittels eines so genannten Knock in Allels. Die Überexpression von IL-6 führt zu polyklonaler Plasmazytose mit Autoantikörperproduktion, Glomerulonephritis, einem Anstieg der Megakaryozytenanzahl, Neuropathologie, Expression von Akut-Phase-Proteinen und Nichtausbildung der Blut-Hirn-Schranke (Suematsu et al., 1989; Campbell et al., 1993; Brett et al., 1995; Woodroffe et al., 1992). Durch die simultane Expression von löslichem IL-6Ra (gp80) und IL-6 ist es möglich, alle gp130 positiven Zellen kontinuierlich zu stimulieren. IL-6/sgp80 doppeltransgene Mäuse zeigen eine verdickte Herzventrikelwand. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit dem Ergebnis bei gp130-defizienten Tieren, bei denen eine stark verdünnte Herzventrikelwand festzustellen ist (Hirota et al., 1995; Yoshida et al., 1996). In diesen doppeltransgenen Mäusen war die Regeneration axotomisierter Nerven beschleunigt (Hirota et al., 1996). Außerdem zeigten diese Tiere eine verstärkte extramedulläre Hämatopoese in Leber und Milz, Thrombozytose,

Hypergammaglobulinaemie und Infiltration von Lymphozyten in zahlreichen Organen (Taga und Kishimoto, 1997; Peters et al., 1997). Bei der Expression eines dominant-negativen gp130-Allels in transgenen Mäusen erfolgt nach vollzogener Immunisierung ein fast völliges Ausbleiben der Antikörperproduktion mit Ausnahme von IgM. Ohne Immunisierung ist jedoch bei den natürlichen Serumantikörperkonzentrationen kein Unterschied festzustellen (Kumanogoh et al., 1997).

## 1.5 Die Akut-Phase-Antwort

Infektionen, Gewebsverletzungen oder Verbrennungen verursachen systemische und lokalisierte Entzündungen. Diese Entzündungsprozesse lösen eine ganze Reihe von Reaktionen, wie Fieber, Schläfrigkeit, Anorexie, Kachexie, Hypoglykämie sowie einen Anstieg der Konzentration von Akut Phase Proteinen (APP) im Blut, aus (Kushner et al., 1982; Baumann und Gauldie 1994). Die Akut-Phase-Proteine werden primär in den Hepatozyten synthetisiert und dienen 1) der Pathogenabwehr wie z.B. C-reaktives Protein, Mannan-bindendes Protein, Komplementproteine, Serum Amyloid P (SAP) (Mortensen et al., 1983), 2) der Wundheilung z.B. Fibrinogen, SAP, 3) der Proteaseinhibition z.B.  $\alpha$ 1-Antitrypsin ( $\alpha$ 1-proteinase inhibitor),  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin, SAP, 4) dem Schutz vor reaktiven Radikalen z.B. Ceruloplasmin, Hemopexin, Haptoglobin. Die Synthese von APP wird durch Zytokine stimuliert. Zusätzlich gibt es so genannte negative APP, deren Konzentration bei Entzündungsreaktionen abnimmt, wie beispielsweise Albumin oder Transferrin. Eine besondere Rolle spielen hierbei gp130-abhängige Zytokine, die alle in der Lage sind, die Synthese von APP anzuregen. Außerdem sind IL-1, TNF $\alpha$  sowie Corticosteroide involviert (Baumann 1990; Benigni 1996). Die Regulation erfolgt überwiegend auf der transkriptionellen Ebene, wobei zwei Klassen von Akut Phase Genen unterschieden werden: Klasse I Gene (Haptoglobin, Hemopexin, SAA, SAP) benötigen IL-1, Zytokine der gp130-Familie und Glucocorticoide zur maximalen Induktion, wohingegen Klasse II Gene ( $\alpha$ 1-Antitrypsin, Fibrinogen,  $\alpha$ -2-Makroglobulin) nur durch gp130-Signale und Glucocorticoide reguliert werden (Baumann 1990; Baumann und Gauldie 1994).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen unterschiedlicher medizinischer Situationen ist es von großer Bedeutung den Regenerationsprozess der Leber zu verstehen und möglicherweise therapeutisch einzugreifen. In Vorarbeiten zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen den IL-6 Serumkonzentrationen, gp130 abhängigen Signalwegen und der Hepatozytenproliferation nach Leberschädigung. Deshalb ist eine genauere molekulare Untersuchung gp130-abhängiger Signalwege für die Leberregeneration von großem Interesse.

Hauptziel dieser Arbeit war daher die Klärung der Funktion gp130-abhängiger Signalwege im Rahmen der Leberregeneration. Dabei wurden zwei unterschiedliche Ansätze im Modell der 2/3-Hepatektomie verfolgt.

- 1) Durch Stimulation mit hIL-6 in hsgp80 transgenen Tieren sollte der Einfluß einer starken Aktivierung gp130-abhängiger Signalwege auf den Regenerationsprozess untersucht werden.
- 2) Mit konditionalen gp130 Knock out Tieren sollte die embryonale Letalität des konventionellen gp130 Knock out Allels umgangen werden und somit die Bedeutung dieses Rezeptors und der von ihm abhängigen Signalwege für den Ablauf und die Regulation des Regenerationsprozesses der Leber untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Bakterienstämme

JM 109:  $F' traD36lacI^q \Delta(lacZ)M15 proA^+B^+/e14^-(McrA^-) \Delta(lac-proAB) thi gyrA96$   
( $Nal^r$ )  $endA1 hsdR17 (r_K^- m_K^+) relA1 supE44 recA1$

MC 1061/P3: $F^- araD139 \Delta(ara-leu)7696 galE15 galK16 \Delta(lac)X74 rpsL (Str^r) hsdR2$   
( $r_K^- m_K^+$ )  $mcrA mcrB1$ (Invitrogen) ist ein E.coli –Stamm, der das P3-  
Plasmid trägt, das die Replikation von Plasmid-DNA, die das tRNA-  
Suppressor F-Gen (SupF) codiert, unterstützt.

One-Shot-Zellen entstammen dem pCR 2.1-Vektor-Kit der Fa. Invitrogen

### 2.2 Medium für Bakterien

LB-Medium: ad 1000 ml  $H_2O$ : 10 g *Bacto*-Pepton, 5 g *Bacto*-Hefe-Extrakt, 10 g NaCl, das Medium wurde autoklaviert und zur plasmidspezifischen Selektion wurde unmittelbar vor Inkulturnahme Antibiotika zugegeben.

LB-Agarplatten: 1 l LB-Medium wurde mit 15 g Agar versetzt und autoklaviert. Zur Selektion plasmidpositiver Kone wurde das erforderliche Antibiotikum, nach Abkühlung auf unter  $60^\circ C$ , zugefügt und der Ansatz in Petrischalen ausgegossen. Nach dem Aushärten wurden die Platten bis zur Verwendung bei  $4^\circ C$  gelagert.

### 2.3 Verwendete Plasmide

pBS (Fa. Stratagene): Klonierungsvektor mit MCS (multiple cloning site), Ampicillinresistenz und Blau-Weiß Selektionsmöglichkeit

pBS-Haptoglobin: Bluescript-Plasmid, das ein ca. 900 bp umfassendes cDNA-Fragment des humanen Haptoglobins enthält. Das 0.9 kb große humane Haptoglobin-cDNA-Fragment lässt sich mit HinfI ausschneiden und als Sonde in Northern-Blot-Analysen einsetzen. Das Plasmid trägt eine Tetracyclin-Resistenz. Es wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Rose-John, Mainz, zur Verfügung gestellt.

pBR322-GAPDH: Vektor, der eine 1,2 kb umfassende cDNA des GAPDH-Gens enthält. Dieses kann mit PstI herausgeschnitten werden und wurde als Sonde für Northern-Blot-Analysen eingesetzt.

pBS- $\beta$ -Actin: Vektor der eine 250 bp umfassende cDNA des  $\beta$ -Actin Gens enthält. Die  $\beta$ -Actinprobe kann mit KpnI und XbaI aus dem Plasmid herausgeschnitten werden und wurde für Northern-Blot-Analysen eingesetzt.

pRS1-SAA-2: Vektor der eine 1,4 kb umfassende cDNA des SAA-2 Gens enthält. Die SAA-2 Probe kann mit EcoRI und PstI aus dem Plasmid herausgeschnitten werden und wurde für Northern-Blot-Analysen eingesetzt.

pGEM-Alb2: Vektor der eine 600 bp umfassende cDNA des murinen Albumingens enthält. Die Albuminprobe kann mit HindIII aus dem Plasmid herausgeschnitten werden und wurde für Northern-Blot-Analysen eingesetzt.

## 2.4 Rekombinante Proteine

rhIL-6: Rekombinantes humanes IL-6 wurde in *E. coli* produziert und wie beschrieben präpariert (Van Dam et al., 1993)

## 2.5 Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Aceton	Merck
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	Roth
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	Gibco
Agarose (Electrophoresis grade)	Gibco
Agarose (Sea Plaque)	Gibco
Ammoniumacetat	AppliChem
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Sigma
Aprotinin	Sigma
ATP	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Agar noble	Gibco
Hefeextrakt	Gibco
Bacto-Tryptone	Gibco
BES (N,N-bis (2-Hydroxyethyl)-2 aminoethansulfonsäure)	Sigma
Bromphenolblau	Serva
BSA (Bovines Serumalbumin)	Serva
Calciumchlorid	Merck

Carbenicillin	Serva
Cäsiumchlorid	Sigma
Chloroform	J.T.Baker
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
dNTPs	Applichem
DMEM mit Glutamax-I	Gibco
EDTA (N,N;N',N'-Ethylendiamintetraacetat)	Merck
EGTA (Ethylenglykol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat)	Sigma
Essigsäure	J.T.Baker
Ethanol	J.T.Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerol	Serva
Glycylglycin	Sigma
Glycin	AppliChem
Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure)	ICN
Isopropanol	J.T. Baker
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhexacyanoferrat (II)	Merck
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Merck
Luciferin-Natriumsalz	AppliChem

Lysozym	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Magermilchpulver	Serva
Methanol	J.T.Baker
MOPS (3-(N-Morpholin)propansulfonsäure	Sigma
Natriumhydroxid	Merck
Natriumacetat	AppliChem
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat	Sigma
Natriumfluorid	Merck
Natriumvanadat	Merck
Nonidet-P-40 (NP-40)	Sigma
ONPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid)	Sigma
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	Gibco
Pefabloc	Boehringer
Poly(dI-dC)-Poly(dI-dC)	Pharmacia
Polyethylenglycol 8000 (PEG-8000)	Sigma
Roti-Blue	Roth
Rotiphenol/Chloroform	Roth
RPMI 1640	Gibco

Saccharose	Merck
Salzsäure	Riedel-de- Häen
Spermidin	Sigma
Spermin	Sigma
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma
TLCK (N-p-Tosyl-L-Lysin-Chloromethylketon)	Sigma
TPCK (N-Tosyl-L-Phenylalanin-Chloromethylketon)	Sigma
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	AppliChem
Triton-X-100	Sigma
Trypsin	Seromed
<i>Tryptose phosphate broth</i>	Gibco
Tween 20	Serva
X-gal (5-Bromo 4-chloro 3-indolyl-Galactosid)	Sigma
Xylencyanol	Merck

## 2.6 Radiochemikalien

Alle Radiochemikalien wurden als Redivue-Präparate von der Fa. Amersham bezogen.

$^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP für die Markierung von Oligonukleotiden

$^{32}\text{P}$ - $\alpha$ -dCTP für den Einbau beim Random priming für DNA-Sonden

## **2.7 Molekulargewichtsmarker**

### **2.7.1 DNA-Marker**

1kb-Leiter (Fa. Gibco BRL)

### **2.7.2 Protein-Marker**

Prestained SDS-PAGE-Standards, Low-Range (Fa. BioRad)

## **2.8 Enzyme**

Restriktionsendonukleasen (Fa. Biolabs, New England)

T4-Kinase (Polynukleotid-Kinase, Fa. Biolabs)

DNase I, RNase-free (Fa. Boehringer, Mannheim)

## **2.9 Antikörper**

Anti-rabbit-STAT3-Antikörper (Fa. Santa Cruz)

Phospho-specific-STAT3-Antikörper (Fa. Biolabs)

Anti-rabbit-STAT1-Antikörper (Fa. Santa Cruz)

Anti-mouse-Peroxidase-conjugated-Antikörper (Fa. Dianova)

Anti-mouse-BrdU-Antikörper (Fa. Amersham)

Anti-ERK-2-Antikörper (Fa. Santa Cruz)

Anti-p50-Antikörper (Fa. Santa Cruz)

Anti-p65-Antikörper (Fa. Santa Cruz)

Anti-p21/waf1-Antikörper (Fa. Santa Cruz)

Anti-Cyclin A-Antikörper (Fa. Santa Cruz)

Anti-Cyclin E-Antikörper (Fa. Santa Cruz)

## 2.10 Oligonukleotide

SIE Stat Konsensusoligo für Gel-shift-Analyse:

5'-GTG CAT TTC CCG TAA ATG TTG TCT ACA-3'

5'-CAC GTA AAG GGC ATT TAC AAC AGA TGT-3'

AP-1 Oligo für Gel shift Analyse:

5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3'

5'-GCG AAC TAC TGA GTC GGC CTT-3'

NFkB Oligo für Gel shift Analyse:

5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'

5'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-3'

## 2.11 Sonstige Materialien

Centrifuge-Tubes, Ultra-Clear™ (Fa. Beckman)

ECL-Detection Kit (Fa. Amersham)

3MM Filterpapier (Fa. Whatman)

Filmkassetten mit Verstärkerfolien (Fa. Kodak)

Fotofilm Ektachrom 400/100 (Fa. Kodak)

Grundausrüstung für Tieroperationen (MHH)

Homogenisator und Homogenisierungskolben (Fa. Braun)

Kulturplatten (Bakterien) (Fa. Greiner)

Nylon-Membran für Northern- (Fa. NEN-Life Science) und Western- (Fa. Millipore)

Blot-Analysen

Röntgenfilme (Fa. Amersham)

Zentrifugenröhrchen, steril (10 ml) (Fa. Sarstedt)

Zentrifugenröhrchen, steril (5 ml) (Fa. Sarstedt)

## 2.12 Geräte

Elektrophorese-Apparaturen (Fa. Von Keutz, Fa. Pharmacia Biotech, Fa. Serva (Blue Line))

ß-Counter (Fa. Berthold)

Cryostat Microm HM 500 OM (Fa. Omega)

Heizblock (Fa. Eppendorf)

Luminometer (Fa. Berthold)

Slot-Blotter (Fa. Schleicher & Schuell)

Spannungsgeräte (Power-Supply) (Fa. Pharmacia Biotech)

Spektralphotometer (Fa. Contron)

Tank-Blot-Apparat (Fa. Bio-Rad)

Ti-70-Rotor und SW 28.1-Swinging-Bucket-Rotor (beide Fa. Beckman)

Vortex (Fa. Omnilab)

Zentrifugen: Tischzentrifuge (Fa. Eppendorf)

Laborzentrifugen 2 K 15 (Fa. Sigma) und GS-6G (Fa. Beckman)

Ultrazentrifuge (Fa. Beckman)

UV-Stratagene 1800 Crosslinker (Fa. Stratagene)

## 2.13 2/3 Hepatektomie

Die für die Experimente eingesetzten männlichen Mäuse waren 6 bis 9 Wochen alt und stammten aus der eigenen Zucht im Institut für Versuchstierkunde der Medizinischen Hochschule Hannover. Die Tiere wurden unter sterilen Standardbedingungen mit normalem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. 12 Stunden vor dem Operationsbeginn wurde den Tieren die Nahrung entzogen. Die Betäubung der Tiere erfolgte mit einer Mischung aus 10%-iger Ketamin-Lsg. (Fa. WDT) und 2%-iger Rompun-Lsg. (Fa. Bayer) und wurde wie folgt zusammengesetzt:

50µl	2%-ige	Rompun-Lsg.
450µl	10%-ige	Ketamin-Lsg.
4500µl	physiologische	Kochsalz-Lsg.

Den Tieren wurde 100 µl Narkosemittel pro 10g Mausekörpergewicht intraperitoneal injiziert. Das Abdomen der Tiere wurde unterhalb des Xyphoids geöffnet und der mediale, links laterale große Leberlappen, der mediale, links laterale kleine Lappen und der rechts laterale Leberlappen wurden ligiert und entfernt. Das Peritoneum und die Dermis wurden anschließend mit getrennten Nähten geschlossen und postoperativ versorgt (Higgins und Anderson 1931). Die Sham-Operation wurde analog zur 2/3 Hepatektomie durchgeführt allerdings wurde auf die Leber nur ein Druckreiz ausgeübt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Operation wurden 3 bis 5 Tiere, wie oben beschrieben, narkotisiert und anschließend die Restleber gleichzeitig entnommen. Die entnommenen Lebern wurden gepoolt, in eiskaltem PBS gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Parallel zur Entnahme der Leber wurde den Tieren Blut aus der Lebervene entnommen, um Serum zu gewinnen.

## 2.14 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten und genomischer DNA erfolgte durch Elektrophorese in Agarosegelen (0,8 – 1,5% Agarose, 1 x TAE; 0,5 µg/ml Ethidiumbromid). Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit 0.1 Volumen 10 x Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm mit TAE als Laufpuffer.

### 10 x DNA-Ladepuffer:

20 % (w/v) Ficoll 400  
0.1 M EDTA, pH 8.0  
1 % SDS  
0.25 % Bromphenolblau (w/v)  
0.25 % Xylencyanol FF (w/v)

### 40 x TAE (ad 1l) pH 7.2:

193.6 g Tris base  
108.9 g NaAcetat \* 3H<sub>2</sub>O  
15.2 g Na<sub>2</sub>EDTA \*H<sub>2</sub>O  
pH-Wert mit Essigsäure  
einstellen

## **2.15 Gewinnung von nukleären Extrakten aus Gewebe**

Ein Teil der Restleber nach 2/3-Hepatektomie bzw. die Lebern aus unbehandelten Kontrollmäusen wurden für die Präparation von nukleären Extrakten verwendet (Descombes et al., 1990).

Alle Puffersysteme werden mit einem Proteinase-Inhibitor-Cocktail (Fa. Roche) versetzt.

### **2.15.1 Isolation der Zellkerne**

Lebergewebe, welches bis zur Aufarbeitung in kaltem PBS lagerte, wurde in Homogenisationspuffer (2,2 M Succrose) mit einem Potter homogenisiert. Das Lebergewebe wurde dabei in einem 7-fachem Volumen des Puffers aufgenommen (1 g Leber = 7 ml Succrosepuffer). Das Homogenat wurde auf ein 2,0 M Succrosekissen (4,5 ml) geschichtet und zur Sedimentation der Zellkerne in einem 28.1-Swinging-Bucket-Rotor der Fa. Beckman bei 25000 rpm 1 Stunde bei 4°C ultrazentrifugiert.

#### Succrosepuffer:

2,2/2,0 M Succrose

10 mM HEPES, (pH 7,6)

15 mM KCl

0,5 mM Spermine

0,5 mM Spermidine

1 mM EDTA

10% Glycerol

### **2.15.2 Gewinnung nukleärer Extrakte**

Das nach Ultrazentrifugation erhaltene Kernpellet wurde in 3 ml Kernlysepuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Kerne bei 4°C mit einem Potter (Pestle A, Fa. B. Braun) vorsichtig homogenisiert. Eine Probe der lysierten Zellkerne wurde mit

einer 0,5 %-igen SDS-Lsg. 1:20 verdünnt. Im Spektralphotometer wurde der DNA-Gehalt bei 260 nm bestimmt. Die Kernsuspension wurde auf 0,5 mg DNA/ml mit Kernlyse-Puffer eingestellt. Zur Präzipitation der DNA wurde 4 M Ammoniumsulfatlösung, pH 7,9, bis zu einer Endkonzentration von 0,4 M zugegeben und 30 min bei 4°C inkubiert. Die DNA wurde durch eine 60 min Ultrazentrifugation bei 35000 rpm und 4°C in einem TI-70 Rotor der Fa. Beckman pelletiert.

Der Überstand wurde mit festem Ammoniumsulfat (0,3 g/ml Suspension) zur Präzipitation der Proteine versetzt und 30 bis 60 min bei 4°C vorsichtig geschüttelt. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt für 25 Minuten bei 35000 rpm und 4°C im TI-70 Rotor (Fa. Beckman). Das entstandene Proteinpellet wurde auf Eis gelagert bzw. in 300 µl Dialysepuffer resuspendiert.

Kernlysepuffer:

10 mM HEPES (pH 7,6)

11 mM KCl

0,1 mM EDTA

0,3 mM MgCl<sub>2</sub>

10 % Glycerol

### **2.15.3 Dialyse nukleärer Extrakte**

Die resuspendierten Proteinpräzipitate wurden zum besseren Lösen und Renaturieren der Proteine 1 Stunde in einem Eisbehälter geschwenkt. Anschließend wurde die Lösung in Dialyseschläuche gefüllt und zweimal für 2 Stunde gegen frischen Dialysepuffer zur Reinigung von niedermolekularen Verunreinigungen dialysiert. Nach einer Zentrifugation für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C in der Eppendorfszentrifuge wurde der Proteingehalt des Überstandes am Spektralphotometer ermittelt (Fa. Contron). Die Proteinextrakte wurden anschließend bei -80°C gelagert.

Dialysepuffer:

25 mM HEPES (pH 7,6)

40 mM KCl

0,1 mM EDTA

## **2.15.4 Bestimmung der Proteinkonzentration**

### **2.15.4.1 Bradford-Assay**

Der Proteinassay basiert auf der Veränderung der Farbabsorption des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250, die nach Bindung an Proteine erfolgt (Bradford et al. 1976).

Die Proteinkonzentration der Kernextrakte wurde teilweise durch dieses Verfahren ermittelt. 2 µl der Extrakte wurden unverdünnt bzw. 1:5 verdünnt mit 798 µl Wasser vermischt und mit 200 µl Biorad-Dye-Reagent-Concentrate (Fa. Biorad) versetzt. Die Proben wurden auf dem Vortex gut durchmischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blaufärbung der Probe wurde bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen, die Proteinkonzentration über eine BSA-Eichreihe (1-20 µg) berechnet.

### **2.15.4.2 Spektralphotometrische Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentrationen der nukleären Extrakte aus Gewebe wurde spektralphotometrisch nach einer Methode von Kalb und Bernlohr (1977) bestimmt. 10 µl der Extrakte wurden mit 490 µl dH<sub>2</sub>O gemischt (1:50). Die Absorption wurde bei 230 und 260 nm gegen einen Nullwert, bestehend aus 10 µl Dialysepuffer und 490 µl dH<sub>2</sub>O, gemessen. Die Proteinkonzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$(187 \times OD_{230} \times 50) - (81,7 \times OD_{260} \times 50) = X \mu\text{g/ml Protein}$$

Der Quotient aus OD<sub>230</sub> und OD<sub>260</sub> stellte ein Maß für die Verunreinigung der nukleären Extrakte mit DNA dar.

## 2.16 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Polyacrylamidelektrophorese wird zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht eingesetzt. Die Auftrennung erfolgt in einem elektrischem Feld. Anschließend kann man die Proteine im Gel anfärben und nachweisen oder aber auf eine Membran transferieren.

Die Proteine werden in SDS-Probenpuffer denaturiert und in Polyanionen überführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt durch Elektrophorese in denaturierenden SDS-Gelen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte. Sie werden durch Coomassie-färbung oder Western-Blot als Proteinbanden dargestellt. Die Größe der Proteine wird im Vergleich mit einem definierten Molekulargewichtsstandard bestimmt (Lämmli et al., 1970).

5 µg Proteinlösung (20 µg bei größeren Gelapparaturen) wurden mit H<sub>2</sub>O auf ein einheitliches Volumen aufgefüllt, mit 3 x SDS-Auftragspuffer versetzt und bei 95°C 5 min aufgeköcht. Die Ansätze sowie 10 µl eines Molekulargewichtsstandards (Fa. Biorad) wurden, soweit nicht anders beschrieben, auf ein 10 %-iges SDS-Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt bei 30 mA im Sammel- bzw. 35 mA im Trenngel solange, bis die blaue Bromphenolblau-Lauffront die untere Gelkante erreicht hatte.

### 10 %-iges Trenngel (ad 30 ml):

10 ml 30 % Acrylamid/  
0,8 % Bisacrylamid  
7,5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8  
12,2 ml H<sub>2</sub>O  
300 µl 10 %-ige APS-Lsg.  
30 µl TEMED

### 5 %-iges Sammelgel (ad 5 ml):

0,85 ml 30 % Acrylamid  
0,8 % Bisacrylamid  
0,625 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8  
7,5 ml H<sub>2</sub>O  
50 µl 10 %-iges APS-Lsg.  
5 µl TEMED

### 10 x SDS-Laufpuffer (ad 1000ml):

30,3 g Tris Base (250 mM)  
144 g Glycine (1,92 M)  
10 g SDS (1%)

### 3 x Probenauftragspuffer:

150 mM Tris/HCl, pH 6,8  
6 % SDS  
15 mM DTT  
30 % Glycerol  
0,25 % Bromphenolblau

## 2.17 Gelfärbung mit Coomassie-Brilliant Blue

Die im Polyacrylamidgel durch Elektrophorese aufgetrennten Proteine werden mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue dargestellt. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei 0,1 – 2 µg pro Proteinbande. Die auf das Gel geladene Proteinmengen lassen sich optisch abschätzen, so daß Coomassie-gefärbte Gele als Ladungskontrolle für weitere, in dieser Arbeit verwendete Verfahren (Western-Blot, Kinase-Assay) dienen. Es wurde eine fertige kolloidale Coomassie-Suspension der Fa. Roth gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

## 2.18 Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis spezifischer Proteine. Die elektrophoretische aufgetrennten Proteine werden unter elektrischer Spannung im nassen Milieu auf eine Membran transferiert (Lämmli et al.,1970). Dort werden diese mit Hilfe spezifischer primärer Antikörper, an die sich sekundäre Peroxidase-gekoppelte Antikörper anlagern, markiert.

In einer Licht emittierenden Peroxidase-Reaktion werden die spezifischen Proteinbanden auf einem Röntgenfilm nachgewiesen.

Die durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden in einer Standard-Naßblotkammer auf eine Nylonmembran transferiert (Maniatis et al., 1989). Der Proteintransfer wurde im Transferpuffer bei 4°C bei konstant 20 Volt über Nacht, bzw. bei 450 mA über 2 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde die Membran durch eine 1-stündige Inkubation in Roti-Blok (Fa. Roth/1:10 Verdünnung in H<sub>2</sub>O) oder in 5 %-iger Magermilchlösung in TBS-Tween gegen unspezifische Proteinbindung abgesättigt. Es folgte, nach kurzem Waschen in TBS-Tween, die einstündige Inkubation mit dem spezifischem primären Antikörper, der nach den Angaben der jeweiligen Hersteller in Waschpuffer verdünnt wurde. Nach dreimaligem Waschen wurde die Membran über einen Zeitraum von einer Stunde mit einer 1:10000 bzw. 1:20000 Verdünnung des sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörpers inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde der Blot abschließend mit dem Substratansatz gemäß den Angaben des Herstellers (ECL-Western-Blot-analysis System-Enhanced Chemilumineszens, Fa. Amersham) entwickelt. Die durch

die Peroxidase-Reaktion emittierten Lichtsignale wurden auf einem Röntgenfilm dargestellt.

Die Nylonmembranen konnten, nach erfolgter Proteindetektion durch eine 30-minütige Inkubation mit Stripping-Puffer bei 70°C, von den Antikörpern befreit und somit erneut zum Nachweis eines weiteren Proteins verwendet werden.

Transferpuffer, pH 8,3:

39 mM Glycine

48 mM Tris-HCl

0,037 % SDS

20 % Methanol

Waschpuffer (TBS-Tween) pH 7,6:

20 mM Tris-HCl

137 mM NaCl

0,1 % Tween 20

pH-Wert mit 1 M HCl einstellen

Stripping-Puffer, pH 6,7:

65,5 mM Tris-HCl

2 % SDS

100 mM 2-Mercaptoethanol

## **2.19 Gel-Shift-Analyse (Gel-Retardation-Assay)**

Diese Methode dient der Darstellung der Interaktion von Proteinen mit DNA-Fragmenten. Dazu wird ein Oligonukleotid, welches eine mögliche DNA-Zielsequenz für das zu untersuchende Protein darstellt, mit Gesamtproteinextrakten inkubiert, wobei es zur Ausbildung spezifischer Protein-DNA-Komplexe kommt. Anschließend folgt eine elektrophoretische Auftrennung in einem nativen Acrylamidgel, wobei DNA-Proteinkomplexe aufgrund ihres veränderten Laufverhaltens gegenüber des freien, ungebundenen Oligonukelotides dargestellt werden können (Singh et al., 1986).

Im Super-Shift-Assay wird das an der Komplexbildung beteiligte Protein durch die Zugabe spezifischer Antikörper identifiziert. Der Antikörper bindet an den Komplex aus Protein und DNA und führt somit zu einer weiteren Veränderung des Laufverhaltens im Polyacrylamidgel. Ist der Antikörper gegen die DNA-bindende

Domäne des Proteins gerichtet, so verhindert die Zugabe dieses Antikörpers die spezifische Komplexbildung an das Oligonukleotid.

### **2.19.1 Herstellung der doppelsträngigen DNA-Sonde**

Gleiche Mengen komplementärer DNA-Einzelstränge (jeweils 50 µg) wurden mit 26 µl 10 x Annealing-Puffer versetzt und mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 260 µl aufgefüllt. Nach 5-minütigen Erhitzen bei 95°C, erfolgte das Zusammenlagern der beiden Einzelstränge während des langsamen Abkühlens auf Raumtemperatur (über Nacht). Die DNA-Doppelstränge wurden bei 4°C gelagert.

#### 10 x Annealingpuffer:

200 mM Tris-HCl, pH 7,6

100 mM MgCl<sub>2</sub>

500 mM NaCl

### **2.19.2 Radioaktive Endmarkierung der doppelsträngigen DNA-Sonde**

Durch die Polynukleotid-Kinase des Bakteriophagen T4 (Fa. Biolabs) wurde die doppelsträngige DNA-Sonde an den endständigen 5'-Hydroxygruppen mit P<sup>32</sup>-γ-ATP (Fa. Amersham) markiert. Nach einer 60-minütigen Inkubation des Reaktionsansatzes bei 37°C, wurden die markierten Oligonukleotide über eine Nick-Spin-Column (Fa. Pharmacia) von nicht gebundenem freiem P<sup>32</sup>-γ-ATP gereinigt. Die Effizienz der Markierung bzw. die radioaktive Aktivität der DNA-Sonde wurde am β-Counter ermittelt.

#### Reaktionsansatz:

3,3 µl Oligonukleotid (125 ng)

2,0 µl 10 x T4-Kinase-Puffer

9,7 µl H<sub>2</sub>O

1,0 µl T4-Kinase

### 2.19.3 Durchführung der Gel-Shift-Analyse

Im Reaktionsansatz wurden zur Proteinlösung (1-5 µg) 4 µl 5 x Bindungspuffer, 2 µl 10 x Proteinase-Inhibitorcocktail, 1 µl Poly dl:dC (1 µg/µl), 1 µl BSA (10 µg/µl in H<sub>2</sub>O) und <sup>32</sup>P-markiertes Oligonukleotid (30000 cpm/Reaktionsansatz) gegeben und mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Als Kontrolle diente der gleiche Bindungsansatz ohne Proteinzugabe. Die Reaktionsansätze wurden 30 min auf Eis inkubiert, anschließend wurde 2 µl Auftragspuffer (20 %-ige Ficoll suspension) zugegeben. Die Proben wurden auf ein nicht denaturierendes 5 % -iges Acrylamidgel aufgetragen und über einen Zeitraum von 2 Stunden bei konstant 300 Volt aufgetrennt. Das Gel wurde nach 15-minütiger Fixierung unter Vakuum getrocknet und bei -80°C auf einem Röntgenfilm exponiert.

Super-Shift-Experimente wurden nach dem gleichen Protokoll durchgeführt, jedoch erfolgte nach der Inkubation des Reaktionsansatzes die Zugabe des spezifischen Antikörpers (0,5 -2 µg/Probe) und eine 45-minütige Inkubation auf Eis.

#### 5 %-iges Polyacrylamidgel, ad 50 ml:

2,5 ml 5 x TBE  
8,3 ml 30 % Acrylamid/  
0,8 % Bisacrylamid  
39,2 ml dH<sub>2</sub>O  
350 µl 10 %-ige APS-Lsg.  
50 µl TEMED

#### 0,25 x Laufpuffer, ad 1500 ml:

75 ml 5x TBE  
1425 ml dH<sub>2</sub>O

#### 10 x Proteinase-Inhibitor-Cocktail, ad 1 ml:

20 µl 1 M DTT  
20 µl 0,1 M Pefabloc  
200 µl Aprotein-Lsg.  
760 µl dH<sub>2</sub>O

#### 5 x Bindungs-Puffer, ad 1 ml:

125 µl 1 M HEPES, pH 7,6  
50 µl 0,5 M MgCl<sub>2</sub>  
170 µl 1 M KCl  
655 µl dH<sub>2</sub>O

5 x TBE :

0,045 M Tris-base

0,44 M Borsäure

1 mM EDTA, pH 8,0

Gelfixierer :

10 % Essigsäure

20 % Methanol

## **2.20 Erk-Kinase-Assay**

Diese Methode dient der direkten Messung der ERK-Kinase-Aktivität durch die Darstellung der Phosphorylierung des spezifischen Substrates "myelin basic Protein" (MBP). Die Messung der Erk-Kinase erfolgte mittels Immunpräzipitation, wobei die Kinase über einen spezifischen Antikörper an Protein A-Agarosebeads gebunden wurde. An diesen erfolgte anschließend die Phosphorylierung des Erk-Substrates MBP.

### **2.20.1 Immunpräzipitation und Kinasereaktion**

Zunächst wurden die Extrakte mit Protein A-Agarose und Kaninchenserum vorinkubiert, um unspezifische Bindungen zu verringern. Hierzu wurden 30 µl Protein A-Agarose (Fa. Boehringer Mannheim, 1:1 Suspension in PBS) mit 2 µl Kaninchenserum und Kernextrakten mit einem Proteingehalt von 30 bzw. 50 µg 1h bei 4°C im „Über-Kopf-Schüttler“ inkubiert. Das Volumen wurde mit dem Assoziationspuffer auf 500 µl aufgefüllt.

Anschließend wurden die Beads bei 6000 rpm in der Eppendorffzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde zur Immunpräzipitation mit 0,8 µg anti-Erk 1 und anti-Erk 2 Antikörpern (Fa. Santa Cruz/ Endkonzentration in einem Volumen von 500 µl : 1,5 µg/ml) über einen Zeitraum von 3 Stunden, unter ständigem Rotieren, bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Protein A-Agarosesuspension erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C im „Über-Kopf-Schüttler“.

Die Proben wurden bei 6000 rpm abzentrifugiert und viermal mit Assoziationspuffer bzw. Kinasepuffer gewaschen. Für die Kinasereaktion wurde das Pellet in 50 µl Kinasepuffer inkubiert. Dieser enthielt 5 µCi <sup>32</sup>P-γ-ATP (Fa. Amersham) und als

Substrat 250 µg/ml Myelin basic –Protein (MBP, Fa. Sigma). Die 30-minütige Reaktion erfolgte bei 30°C.

Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Proben kurz auf Eis gestellt und mit 25 µl 3 x Proteinladepuffer (Lämmli) versetzt und 5 min bei 95°C gekocht. Die Auftrennung der markierten Proteine erfolgte in einem 12,5 %-igen Acrylamid-Proteingel bei 35 mA. Das Gel wurde anschließend getrocknet und auf einem Röntgenfilm (Fa. Kodak) bei -80°C exponiert.

Assoziationspuffer:

150 mM NaCl  
10 mM Tris/HCl (pH 7,4)  
1 mM EDTA  
1 % NP-40

Inhibitoren:

1 mg/ml NaF  
0,4 mg/ml Na<sub>2</sub>OPO<sub>4</sub>  
0,5 mM Pefabloc  
50 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  
0,5 µg/ml Leupeptin  
2 mg/ml Aprotinin

Kinaepuffer:

40 mM Hepes (pH 7,5)  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
3 mM MnCl<sub>2</sub>

Zusätze:

5 µCi/Probe <sup>32</sup>P-γ-ATP  
150 µg/ml MBP

## 2.21 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Die Konzentrationen von IL-6 und löslichem hspg80 im Blutserum von Mäusen wurde mittels ELISA (Voller et al., 1980) bestimmt. Alle Tests beruhen auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA. Die Tests wurden in Rundboden-Mikrotiterplatten (Fa. Costar) durchgeführt. Die Platten wurden über Nacht bei 4°C mit dem Primärreagenz beschichtet, für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit PBS/BSA/AZID geblockt und mit seriellen Probenverdünnungen (6 Schritte a 1:5) beschickt. Die letztlich verwendeten Verdünnungen als auch die Inkubationszeiten wurden je nach ELISA optimiert. Nach Waschen mit Wasser erfolgte die Inkubation mit Sekundärreagenz, Tertiärreagenz

usw. gemäß der Anleitung des Herstellers (Fa CLB). Die Bestimmung der Extinktion bei 405 nm wurde mit einem ELISA-Reader (Fa. Anthos Labtech Instruments) durchgeführt.

## **2.22 Zell-Proliferations-Assay**

Mit dieser Methode kann die Zellproliferation auch in *in-vivo* Versuchen nachgewiesen werden. Versuchstieren wird ein Thymidin-Analogon (5-bromo-2'-deoxyuridin/BrdU) injiziert, welches bei stattfindender DNA-Synthese in die neu entstehende DNA eingebaut wird. In Gefrierschnitten läßt sich das eingebaute BrdU mittels eines spezifischen Antikörpers markieren und durch einen Peroxidasegekoppelten sekundären Antikörper darstellen. Das Enzym Peroxidase polymerisiert das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), das in den Zellen einen blauen Niederschlag bildet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Cell-Proliferation Kit der Fa. Amersham verwendet.

### **2.22.1 Probengewinnung und Aufbereitung**

Mäusen wurde 2 Stunden vor Entnahme der Leber BrdU (30 µg BrdU/g Lebendgewicht) injiziert. Die Lebern wurden entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es wurden 7,5 µm dicke Cryostatschnitte aus dem Lebergewebe angefertigt. Die Gefrierschnitte wurden in eiskaltem Methanol-Acetongemisch (1:1) für 10 min bei -20°C fixiert, mit TBS-Tween (pH 7,6) gewaschen und 0.5 Stunden in 70 %-igem Ethanol entwässert. Die Schnitte wurden getrocknet und zum Blocken der endogenen Peroxidase-Aktivität für 10 min in eine 3 %-ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Methanol-Lösung gestellt. Anschließend wurde mehrmals mit TBS-Tween (pH 7,6) gewaschen.

### **2.22.2 DNA-Denaturierung**

Die Denaturierung der DNA erfolgte mittels Formamid und NaOH. 190 ml Formamid und 10 ml 1 N NaOH wurden separat auf 70°C erhitzt, zusammengegeben und 8 min

bei 70°C gerührt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte 30 sek. in die Lösung getaucht und mehrfach mit TBS-Tween gewaschen. Abschließend wurden die Proben in einer Mischung aus Formamid (190 ml) und 0,15 Tri-Natriumcitratlösung (10 ml) 15 min bei 70°C neutralisiert (Westermann et al., 1996, Blaschke et al., 1995).

### **2.22.3 Zusätzliche Fixierung**

Die denaturierten Schnitte wurden 2 x 15 min mit kaltem TBS-Tween gewaschen und 30 min in 1 %-igem Formaldehyd und weitere 10 min in 0,2 % Glutaraldehyd fixiert (Blaschke et al., 1995).

### **2.22.4 BrdU-Nachweisreaktion**

Die Gewebeschnitte wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem monoklonalen Anti-BrdU-Antikörper (Fa. Amersham/ 1:10000 in TBS-Tween) inkubiert. Die Schnitte wurden gewaschen und mit dem Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus-Ig2-Antikörper (1:50 in PBS/ 1 % BSA) 30 min inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Enzymreaktion bei 10 min Inkubation in der Substratlösung (0,5 mg DAB/ml Phosphatpuffer). Anschließend wurden die Schnitte mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und mit dem Hämalaun-Kernfarbstoff gegengefärbt.

### **2.22.5 Hämalaun –Färbung**

Für die Färbung der Zellkerne wurde Mayers Hämalaunlösung (Fa. Merck) verwendet. Die Objektträger wurden 10 Sekunden in die Fertiglösung getaucht und anschließend in erwärmten H<sub>2</sub>O gespült. Nach 2 weiteren Wasch-Schritten, 1 x in warmem H<sub>2</sub>O, dann in dH<sub>2</sub>O, wurden die gefärbten Gewebeschnitte mit einem Tropfen Kaisers´Glyceringelatine (Fa. Merck) benetzt und mit einem Deckgläschen versehen.

## **2.23 Transformation, Lagerung, Charakterisierung und Isolierung von Plasmid-DNA**

### **2.23.1 Herstellung kompetenter Zellen**

Bakterien des E. coli-Stammes JM 109 wurden in 25 ml LB-Medium bei 37°C und 225 rpm über Nacht kultiviert. 5 ml dieser Kultur wurden 1:1000 mit LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,45-0,55 bei 37°C angereichert. Die Bakterien wurden 2 Stunden in Eiswasser gestellt, 20 min bei 4°C und 3800 rpm (Beckmann Kühlenzentrifuge, Rotor JA-10) abzentrifugiert und in 20 ml eiskaltem Titrationspuffer resuspendiert. Das Volumen wurde auf 500 ml aufgefüllt und 45 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden 10 min bei 4°C und 3200 rpm (Beckmann Kühlenzentrifuge, Rotor JA-10) abzentrifugiert und in 25 ml kaltem Titrationspuffer aufgenommen. Die Suspension wurde mit 80 %-igem Glycerol bis zu einer Endkonzentration von 15 % versetzt. Die Bakterien wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert (Maniatis et al., 1989)

#### Titrationpuffer:

100 mM CaCl<sub>2</sub>

70 mM MgCl<sub>2</sub>

40 mM Natriumacetat, pH 5,5

### **2.23.2 Transformation**

10 –20 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA wurden mit 100 µl kompetenten Bakterien des E. coli-Stammes JM 109, die vorsichtig auf Eis aufgetaut wurden vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Den Bakterien wurde anschließend ein Hitzeschock (90 sek/42°C) zugeführt und für 2 min auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde in 1 ml LB-Medium aufgenommen und eine Stunde bei 37°C und 225 rpm im Bakterienrüttler inkubiert. 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf einer Agarplatte, welche die den Resistenzgenen der jeweiligen Plasmide entsprechenden

Antibiotika enthielt, ausgestrichen. Die Agarplatte (1,5 % Agar in LB-Medium) wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

### 2.23.3 Vermehrung von transformierten Bakterien

Bakterien wurden als Vorkultur (2 – 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum) bei 37°C über Nacht im Bakterienschüttler inkubiert. Diese Kultur wurde auf ein Volumen von 25 ml mit Medium verdünnt und weitere 10 Stunden kultiviert. Abschließend wurde das Volumen 1:10 mit LB-Medium verdünnt und über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert.

Für DNA-Minipräparationen wurden 1,5 ml Kulturmedium benötigt. Für DNA-Maxipräparationen wurden 200 ml E. coli Kultur bei Plasmiden mit hoher bzw. 500 ml bei Plasmiden mit niedriger Replikationsrate eingesetzt.

#### LB-Medium (ad 1000 ml):

10 g Bacto-Pepton

5 g Bacto-Hefe-Extrakt

10 g NaCl

#### Antibiotika:

Ampicillin 100 µg/ml

Kanamycin 10 µg/ml

Tetracyclin 10 µg/ml

### 2.23.4 DNA-Maxipräparation

Wurden größere Mengen hochreiner Plasmid-DNA benötigt so erfolgte die DNA-Isolierung mit dem Maxi-Plasmid-Kit der Fa. Qiagen. Hier wurden die Bakterien nach der Kultivierung abzentrifugiert und unter alkalischen Bedingungen lysiert. Die freigesetzte DNA wurde anschließend über eine Anionenaustauscher-Säule von den übrigen Bakterienbestandteilen getrennt. Nach Fällung der DNA mit Isopropanol wurde das DNA-Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und in TE-Puffer aufgenommen.

Die Bestimmung der Plasmidkonzentration erfolgte am Spektralphotometer. Die Definition zur Berechnung der DNA-Konzentration lautet:  $A_{260}$  von 1 = 50 µg/ml.

Die Ausbeute an Plasmid-DNA lag zwischen 200 – 500 µg.

### **2.23.5 DNA-Minipräparation**

Mit dieser Methode wurde DNA aus kleinen Bakterienkulturen (5 ml) isoliert. Sie wurde verwendet, um einzelne, neu transformierte Bakterienklone im Restriktionsverdau überprüfen zu können.

1,5 ml einer Übernachtskultur wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 min bei 1000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl STET-Puffer aufgenommen, mit 10 µl Lysozym (10 mg/ml) versetzt und 40 sek bei 95°C erhitzt. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 10000 x g und 4°C wurde das Pellet mit einer sterilen Pipettenspitze entfernt und der Überstand mit 250 µl Isopropanol versetzt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (20 min bei 10000 x g und 4°C) gefällt und anschließend in 30 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. Die DNA konnte bei -20°C gelagert werden.

#### STET-Puffer:

100 mM NaCl

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

5 % Triton X-100

### **2.23.6 Restriktionsverdau der Plasmide**

Die durch Minipräparation gewonnene Plasmid-DNA wurde durch einen Testverdau mit Restriktionsenzymen überprüft. Es wurden Enzyme und Puffersysteme der Fa. New England Biolabs verwendet.

Ansatz für den Restriktionsverdau:

3 µl Minipräparations-DNA

0,5 µl Restriktionsenzym A (20 U/µl)

0,5 µl Restriktionsenzym B (20 U/µl)

2 µl 10 x Restriktionspuffer (entsprechend der Enzyme)      ad 20 µl mit dH<sub>2</sub>O

Nach einer 1 Stunde Inkubationszeit, bei der für die jeweiligen Enzyme optimalen Reaktionstemperatur, wurden die Proben mit 4 µl 6 x DNA-Loading-Puffer versetzt

und in einem 1 %-igen Agarosegel (TAE-Puffer) aufgetrennt. Die DNA wurde durch Ethidiumbromidfärbung dargestellt. Die Identifizierung der Banden erfolgte mit Hilfe eines 1 kb-DNA-Größenmarkers (Fa. GibcoBRL).

6 x DNA-Ladepuffer:

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylenyanol

30 % Glycerol

50 x TAE (ad 1000ml):

242 g        Tris base

57.1 ml     Eisessig

100 ml      0.5 M EDTA, pH 8.0

der pH-Wert wird auf 8.5 mit Essigsäure eingestellt

### **2.23.7 Glycerolstock**

Für eine dauerhafte Lagerung der transformierten Bakterien wurde eine Glycerolkultur angelegt. 600 µl einer Übernacht-Kultur (Selektions-LB-Medium) wurden mit 600 µl 50% -igem Glycerol gemischt und bei –80°C gelagert.

### **2.24 Isolation von genomischer DNA aus Mäuseschwänzen**

Vier Wochen alten Mäusen wurden 1 – 2 cm des Schwanzes reseziert und über Nacht in 750 µl Lysepuffer bei 55°C im Heizblock inkubiert. Das Lysat wurde anschließend gründlich gevortext und mit 250 µl gesättigter Natriumchloridlösung versetzt. Durch das Natriumchlorid wurde die DNA ausgesalzen. Nach 5 min. Inkubation im Schüttler wurden die Ansätze 10 min bei 15000 rpm in der Tischzentrifuge (Fa. Eppendorf) zentrifugiert. 750 µl des Überstandes wurden entnommen und die genomische DNA mit 500 µl Isopropanol präzipitiert. Das Pellet wurde mit 70 % -igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Lysepuffer :

20 mM Tris-HCl, pH 8,0

100 mM EDTA, pH 8,0

100 mM NaCl

1 % 20 % SDS

0,5 mg/ml Proteinase K

## **2.25 Isolation von genomischer DNA aus Mäuselebern**

Die Isolation von genomischer DNA aus der Leber erfolgt entsprechend dem Protokoll für DNA aus Mäuseschwänzen. Für die Isolierung wurden ca. 50 mg der Restleber eingesetzt.

## **2.26 Alkalischer Southern-Blot**

Bei diesem Verfahren wurde die DNA in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Moleküle wurden aus der Gelmatrix auf eine Trägerschicht aus Nitrocellulose oder Nylon transferiert und dort immobilisiert.

10 – 50 µg genomischer DNA wurden mit 50 – 100 U eines geeigneten Restriktionsenzym 12 – 18 h bei der für das jeweilige Restriktionsenzym optimalen Temperatur inkubiert und in einem 1 %-igem Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde 15 min in 0,25 HCl inkubiert und anschließend mit dH<sub>2</sub>O gespült. Zur Denaturierung der DNA wurde das Gel 2 x 15 min in Transferlösung geschwenkt und anschließend mittels Kapillarblot auf Nylonmembranen (Gene-Screen+, Fa. NEN Life Science) transferiert. Nach 12 h wurde die Membran 2 x 15 min in Neutralisierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde die DNA auf der Membran durch UV-crosslinking (Stratalinker, Fa. Stratagene) immobilisiert. Nach Befeuchten in 2 x SSC wurde die Membran für 30 min bei 60°C in einem Hybridisierungsofen (Fa. BACHOFER) mit Hybridisierungslösung prähybridisiert. Die radioaktiv markierte Gensonde (siehe Kapitel 2.32) wurde durch Inkubation für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend zur Hybridisierungslösung zugegeben. Die Hybridisierung selbst

erfolgte für 18 h bei 60°C. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde wurde die Membran im Anschluß an die Hybridisierung zuerst 1 h mit 5 x SSC 0,1 % SDS und anschließend mit 2 x SSC 0,1 % SDS bei 60°C gewaschen. Die Detektion der radioaktiven Banden erfolgte durch Exposition auf einem Röntgenfilm bei -80°C. Um quantitative Resultate zu erhalten, wurde alternativ ein Bio-Imaging Analyser (Fuji Bas 1000, Fa. Fuji Photo Film Co.) und PC-Bas Software (PCBAS Version 2.09f, Fa. raytest Isotopenmeßgeräte GmbH) verwendet.

20 x SSC ad 1000ml:

175.3 g (3 M)        NaCl  
88.2 g (0.3 M)      Na<sub>3</sub>Citrat \* 2 H<sub>2</sub>O  
den pH auf 7.0 mit 1 M HCl einstellen

## **2.27 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die PCR (Saiki et al., 1985 ; Saiki et al., 1988) wurde präparativ (Gensonden, Fragmente zur Klonierung) und analytisch (Genotypisierung von Mäusen, Detektion von Cre-katalysierter Rekombination) eingesetzt.

Um DNA-Fragmente zu amplifizieren wurde in der Regel folgender Reaktionsansatz verwendet:

5.0 µl 10 x Reaktionspuffer (GibcoBRL)  
1.5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub> (GibcoBRL)  
4.0 µl dNTP Mix (je 2.5 µM; GibcoBRL)  
1.0 µl sense Primer (20 µM)  
1.0 µl antisense Primer (20 µM)  
0.5 µl *Thermus aquaticus* DNA Polymerase (5 U/µl; GibcoBRL)  
1.0 µl DNA (ca. 50 ng)  
36 µl H<sub>2</sub>O

Auf einem Thermoblock (Biometra) wurde dann in 30 bis 40 Zyklen folgendes Temperaturprofil durchlaufen:

- 1 min 94°C Denaturierung
- 1 min 56°C Annealing
- 2 min 72°C Primerverlängerung

Um das Cre-Rekombinase-Transgen bei den Mäusen zu detektieren wurde folgende Primerkombination gewählt:

Sense-Primer: 5'-TAA TCG CCA TCT TCC AGC AG-3'

Antisense-Primer: 5'-CAA TTT ACT GAC CGT ACA C-3'

Ein positiver Nachweis erfolgt durch eine 1 kb große Bande.

Um den flox-Status des gp130 Gens zu analysieren wurde folgende Primerkombination gewählt:

Sense-Primer: 5'-GGC TTT TCC TCT GGT TCT TG-3'

Antisense-Primer: 5'-CAG GAA CAT TAG GCC AGA TG-3'

Bei loxP flankiertem Allel wird eine 700 bp Bande gebildet, ansonsten eine etwas kleinere Wildtypbande.

Zum Nachweis einer Cre-Rekombinase vermittelten Deletion des Exon 16 des gp130 Gens wurde folgende Primerkombination gewählt:

Sense-Primer: 5'-CAG GCA GCT TTA TGT TGG AAG T-3'

Antisense-Primer: 5'-CAG GAA CAT TAG GC AGA TG-3'

Eine Deletion kann durch eine 700 bp Bande festgestellt werden.

Zur Generierung einer gp130 Sonde wurden folgende Primer verwendet:

Sense-Primer: 5'-CAG GCA GCT TTA TGT TGG AAG T-3'

Antisense-Primer: 5'-CTC AAG CAA CCT GTC AAA GAT G-3'

## 2.28 RNA Extraktion aus Gewebe

Für die Isolierung von gesamt RNA wurde jeweils ein kleines Gewebestück in der RNAClean™ Lösung (Fa. HYBAID) (2 ml pro 100 mg Gewebe) durch einen Glas-Teflon Homogenisator homogenisiert. Zu 2 ml des Homogenats wurden anschließend 0.2 ml Chloroform gegeben. Anschließend wurden die Proben für 15 Sekunden heftig geschüttelt und danach auf Eis für 5 Minuten inkubiert. Nachdem die Proben für 15 Minuten bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert wurden, wurde die obere wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Zu dieser wässrigen Phase wurde ein gleiches Volumen an Isopropanol gegeben, das Ganze gemischt und bei -20°C für 15 Minuten inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 12000 x g und 4°C. Anschließend mußte der Überstand sehr vorsichtig abgenommen werden, ohne das RNA-Pellet aufzuwirbeln. Das RNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen. Dafür wurden 0.8 ml Ethanol pro 100 µg erwartete RNA zum Pellet gegeben und das Pellet dann für mehrere Sekunden gevortext und anschließend für 8 Minuten bei 7500 x g und 4°C zentrifugiert. Der Waschschrift wurden mindestens einmal wiederholt. Das Pellet wurde dann mittels Vakuum für ca. 10 Minuten getrocknet. Die RNA wurde anschließend in RNase freiem Wasser aufgenommen.

## 2.29 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wird im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt.

Definition der Berechnung der RNA-Konzentration:

$$A_{260} \text{ von } 1 = 40 \text{ } \mu\text{g/ml (spez. RNA-Faktor)}$$

$$A_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{spez. RNA-Faktor} = Y \text{ } \mu\text{g/ml RNA}$$

Bestimmung der RNA-Reinheit:

$$A_{260}/A_{280} = z \text{ (1.8 – 2.0)}$$

Ein guter Reinheitsgrad ist bei einem Wert zwischen 1.8 und 2.0 gewährleistet.

### 2.30 Northern-Blot

Durch eine Northern Blot Analyse kann die RNA-Expressionsstärke von zu untersuchenden Genen bestimmt werden. Die zu untersuchende RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen in einem Formaldehyd-Agarose-Gel entsprechend ihrer Molekulargröße elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde sie mit Hilfe der Blotting-Technik auf eine geeignete Trägermembran transferiert. Mit einer radioaktiv markierten einzelsträngiger DNA, die der gesuchten RNA komplementär ist, kann die RNA durch Autoradiographie der Trägermembran sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe dieses Verfahrens lassen sich die Größe der RNA und auch ihre Menge bestimmen.

### 2.31 RNA-Gelelektrophorese

Die RNA wurde in einem 1.2 %-igem Agarose/ 1 x MOPS/ 0.22 M Formaldehyd –Gel in 1 x MOPS/ 0.22M Formaldehyd-Laufpuffer bei 100 – 150 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Der RNA-Ansatz wurde vor dem Gelauftrag mit 1/5 Volumen RNA-Ladepuffer versetzt und 3 bis 5 Minuten bei 65°C inkubiert.

#### 10 x Mops-Puffer, pH 7, ad 1000ml:

41.8g	Mops(0.2M)
06.8g	Natriumazetat (50mM)
2 ml	0.5 M EDTA, pH 8 (0.01M)

#### 5 x Ladepuffer, ad 10ml:

16	µl	Bromophenol-Blue-Lsg.
80	µl	0.5 M EDTA, pH 8
100	µl	EtBr (Stock 10 mg/ml)
720	µl	37% Formaldehyd
2000	µl	100% Glycerol
3084	µl	Formamid
4000	µl	10 x MOPS

### 2.32 SSC-Semidry-Blot

Bei diesem Verfahren wurde zunächst die zu analysierende RNA unter stark denaturierenden Bedingungen in einem Formaldehyd-Agarose-Gel entsprechend ihrer Molekulargröße elektrophoretisch aufgetrennt. Danach erfolgte deren Transfer auf eine Membran (Northern Blot) und Immobilisation über UV-Kreuzvernetzung (*crosslinking*). Die Hybridisierung mit radioaktiv markierter, der gesuchten RNA-Sequenz komplementärer ssDNA ermöglichte durch anschließende Autoradiographie die semiquantitative Analyse der entsprechenden RNA Expression.

Bei der Northern Blot-Technik wurde die RNA aus dem Agarosegel durch Kapillarkräfte auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Hierzu wurde eine Hybond N<sup>+</sup> Nylonmembran kurz mit bidest. H<sub>2</sub>O benetzt und danach 10 min in 2 x SSC geschwenkt. Der Aufbau der Semi-Dry-Blotapparatur erfolgte dann wie folgend beschrieben (Reihenfolge von oben nach unten):

oben

Glasplatte, beschwert durch ein Gewicht von ca. 500 g

Ein Stapel aus saugfähigem Zellstoff

3x 3MM Whatman Filterpapier, trocken

3x 3MM Whatman Filterpapier, 10 x SSC getränkt

Hybond N<sup>+</sup> Nylonmembran

RNA Agarosegel

6x 3MM Whatman Filterpapier, 10 x SSC Puffer getränkt

unten

Der Blottingprozeß fand über Nacht bei RT statt. Zur Immobilisierung der RNA wurde die Trägermembran dem Blotaufbau entnommen, kurz mit 2 x SSC gewaschen und anschließend bei RT 20 min getrocknet. Eine irreversible, kovalente Bindung der RNA an die Membranoberfläche wurde durch das UV-*Crosslinking* mittels eines Crosslinkers (Fa. Stratagene) erreicht, wobei hochenergetische UV-Strahlung die Quervernetzung induziert.

### 2.33 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Nach einer modifizierten Methode von Feinberg und Vogelstein, 1984 können DNA Fragmente von 100 bis 1000 bp Länge radioaktiv markiert werden. Dazu werden nach Denaturierung des zu markierenden DNA-Strangs Hexanukleotide statistischer Zusammensetzung als Primer hybridisiert. Die Markierung erfolgt während der Doppelstrangsynthese mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I in Gegenwart eines Desoxynukleotidmixes und eines radioaktiv markierten Nukleotids. Diese Methode wurde mit Hilfe des rediprime™II kits (Fa. Amersham), dem Herstellerprotokoll folgend, durchgeführt. Von der zu markierenden DNA wurden 25 ng in 45 µl TE pH 8,0 zur Denaturierung für 5 min auf 95°C erhitzt und schockartig auf Eis abgekühlt. Danach wurde kurz abzentrifugiert. Die denaturierte DNA wurde zu einem *reaction tube* (kit-Bestandteil) hinzugefügt, mit 5 µl Redivue [<sup>32</sup>P]α-dCTP versetzt, gemischt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 gestoppt und der Ansatz über eine S-200 *nick spin column* (Amersham) von nicht inkorporierten Nukleotid befreit. Der Erfolg der Markierung wurde durch Messung einer Probe im β-Szintillationszähler überprüft. 14 µl der markierten DNA-Lösung wurden für 5 ml Hybridisierungspuffer eingesetzt.

### 2.34 RNA-DNA Hybridisierung

Die radioaktiv markierte, spezifische DNA-Sonde bildet hierbei auf der Northern Blot Membran ein Hybrid mit der immobilisierten, komplementären RNA des zu analysierenden Gens. Die Hybridisierung der Membran mit dem radioaktiv markierten DNA-Fragment erfolgte bei 65 °C unter ständiger Bewegung im Hybridisierungssofen über Nacht (Church *et al.*, 1984). Zur Reduktion des Hintergrundes wurde mit der Waschlösung 2 x 15 min und 2 x 30 min gewaschen. Danach wurde die Trägermembran auf einem geeigneten Röntgenfilm (Hyperfilm β Max, Fa. Amersham) oder einem Phosphorimager Screen exponiert. Letzterer bietet die Möglichkeit der relativen Quantifizierung.

Church-Lösung, ad 1000 ml:

250 ml	1 M NaPO <sub>4</sub> , pH 7.2
350 ml	20%-igen SDS-Lsg.
20 ml	0.5 M EDTA, pH 8

Wasch-Lösung, ad 1000 ml:

50 ml	20%-ige SDS-Lsg.
50 ml	1 M NaPO <sub>4</sub> , pH 7,2

### 2.35 Gen-array-Analyse

Durch eine Gen-array-Analyse kann das Expressionsmuster von verschiedenen Genen analysiert werden. Die Probenvorbereitung für den cDNA Expressions-Array erfolgte folgenderweise: 5 Lebern von jeder Gruppe (gp130 Knock out Tiere mit und ohne IL-6 Stimulation; Kontrolltiere mit und ohne IL-6 Stimulation) wurden in RNA Clean Lösung (HYPAID-AAGS) für die Isolation und Aufreinigung von RNA homogenisiert. Die so isolierte RNA der Einzeltiere wurde für jede Gruppe zusammengeführt und mit DNase nach den Vorgaben des Array-Herstellers (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) behandelt. Die Qualität von 10 µg RNA wurde durch denaturierende MOPS Gel Elektrophorese (s. 2.3) untersucht.

Die über eine reverse Transkription nach Herstellerangaben erstellten cDNA Proben von jeder experimentellen Gruppe wurden simultan mit 4 Membranen des Atlas Maus cDNA Expressions-Arrays (Clontech) hybridisiert. In Kürze: 5 µg der DNase behandelten RNA wurde mit <sup>32</sup>P-dCTP inkubiert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die radioaktiv markierten cDNA Proben wurden über Nacht mit den cDNA Arrays in ExpressHyb-Lösung hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C unter kontinuierlicher Bewegung. Nach hoch stringenten Waschschrritten wurden die Membranen über Nacht gegen Phosphorimager-Membranen exponiert.

Die Phosphorimager-Ergebnisse wurden durch zu Hilfenahme von OptoQuant image analysis software (Packard BioScience) interpretiert. Die Quantifizierung von jedem nachweisbarem Signal erfolgte über die digital light units (DLU) die durch OptoQuant erzeugt wurden. Von jedem Signal wurde der zugehörige Hintergrund abgezogen.

Die Array-Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Christian Klein durchgeführt.

## **3 Ergebnisse**

### **3. Einfluß von IL-6 und seiner Rezeptoren auf die Leberregeneration in der Maus**

#### **3.1 Wirkung der Hyperstimulation mit Interleukin 6 auf die Leberregeneration und den Zellzyklus nach partieller Hepatektomie in hsgp80 transgenen Mäusen**

##### **3.1.1 IL-6 induziert eine starke und persistierende Stat 3 Aktivierung in PEPCK/hsgp80 transgenen Mäusen**

PEPCK/hsgp80 transgene Mäuse exprimieren den hsgp80 Rezeptor unter der Kontrolle des Leber- und Nieren-spezifischen PEPCK-Promotors. Diese Tiere, die von Peters et al. generiert wurden, besitzen eine normale Lebenserwartung und sind asymptomatisch (Peters et al., 1997). Diese Mäuse wie auch die entsprechenden Kontrolltiere wurden mit 8 µg humanem IL-6 (hIL-6) pro 25 g Maus durch eine intraperitoneale Injektion stimuliert. Durch diese Injektion erfolgt eine spezifische Aktivierung der IL-6 abhängigen Signalwege. Es wurde bereits beschrieben, daß durch eine derartige Aktivierung eine verlängerte Akut-Phase-Antwort induziert wird (Peters et al., 1996). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach den Injektionen wurden die Tiere getötet und die Lebern entnommen. Aus den Lebern wurden anschließend nukleäre Extrakte gewonnen. Der Stimulationseffekt auf den Stat3- und Ras/MAP-Kinase-Signalweg in diesen Tieren wurde durch Western-Blot- und EMSA-Analysen unter Verwendung der gewonnen Kernextrakte bis zu 48h nach Stimulation untersucht (Abb. 5).

Die Kontrolltiere zeigten eine maximale Translokation von phosphoryliertem Stat3 in den Kern 1 Stunde nach Stimulation, welche bis zu 6 Stunden nach hIL-6 Injektion nachgewiesen werden konnte (Abb.5). Im Zeitraum von 9 bis 48 Stunden nach Behandlung der Tiere konnte kein phosphoryliertes aktives Stat3 mehr nachgewiesen werden. Diese Daten wurden sowohl durch Bindungsstudien mittels

EMSA als auch durch den direkten Nachweis des phosphorylierten Stat3-Proteins in der Western-Blot-Analyse bestätigt. Durch eine Super-shift-Analyse wurde außerdem gezeigt, daß die im EMSA gefundenen Effekte allein durch einen Stat3 Homodimer-Komplex hervorgerufen werden.

Im Gegensatz zu wt-Tieren zeigten hsgp80 transgene Tiere eine verlängerte und verstärkte Aktivierung von phosphoryliertem Stat3 in der Western-Blot-Analyse nach hIL-6 Gabe. Sowohl im Western-Blot- als auch bei der EMSA-Analyse konnte aktives Stat3 bis zu 48 Stunden nach Injektion nachgewiesen werden. Auch in den transgenen Tieren besteht der, das Stat Konsensus Oligo bindende, Komplex aus Stat3 Homodimeren, was wiederum durch einen Super-Shift bestätigt wurde.

Nach Ligandbindung wird neben Stat3 auch der Ras/Map-Kinasesignalweg über gp130 aktiviert. Es wurde deshalb die Phosphorylierung des „*downstream targets*“ ERK mittels eines für die phosphorylierte MAP-Kinase spezifischen Antikörpers in einer Western-Blot-Analyse sowie durch einen ERK-Kinase-Assay die Aktivität der Kinase untersucht.

Die wt-Mäuse zeigten eine ungefähr 50%-ige Erhöhung der ERK Phosphorylierung 12 und 24h nach hIL-6 Injektion (Abb.5). Diese Ergebnisse konnten durch den ERK-Kinase-Assay bestätigt werden.

Die hsgp80 transgenen Tiere hingegen zeigten bei keiner der beiden Analysen eine Veränderung im Phosphorylierungsmuster bzw. der Kinase Aktivität über den betrachteten Zeitrahmen.

Da die Ergebnisse aus dem Phospho-ERK-Western denen des Erk-Kinase-Assays entsprachen, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit keine weiteren Kinase-Assays durchgeführt und der ERK-Signalweg ausschließlich durch Western-Blot-Analyse untersucht.

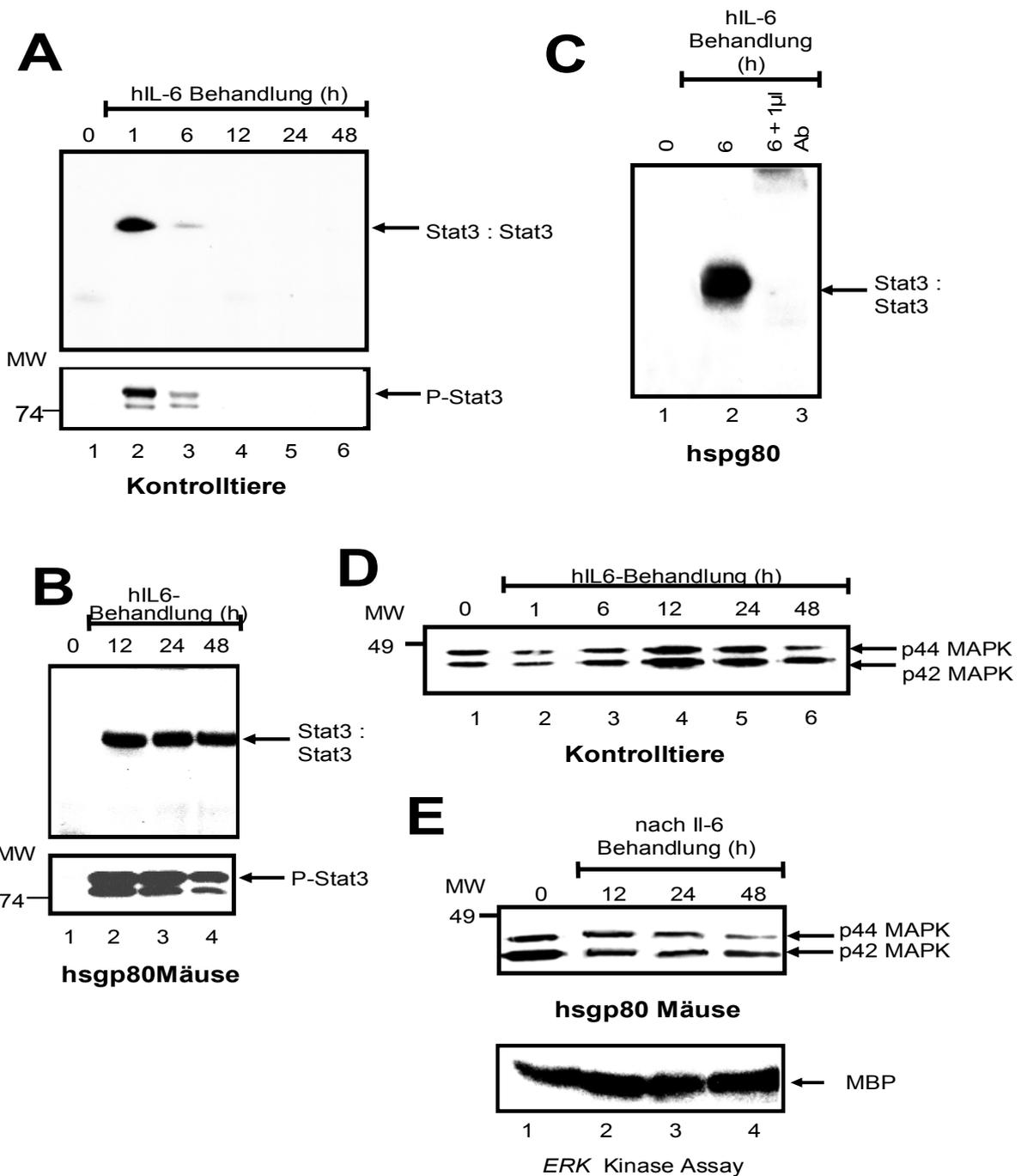


Abb 5: Die IL-6 Stimulation in hspg80 transgenen Mäusen resultiert in einer lang anhaltenden Stat3 Aktivierung. Kontrolltiere und hspg80 transgene Tiere wurden mit 8 µg hIL-6 stimuliert. Nukleäre Leberextrakte wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stimulation präpariert. Um die Stat3 DNA-Bindung zu untersuchen, wurden Gel-shift-Experimente durchgeführt (nur der obere Teil des Gels wird gezeigt). (A und B) obere Teil der Abbildungen: DNA-Bindung nach hIL-6 Stimulation in (A) Kontrolltieren und (B) hspg80 transgenen Tieren. Die Supershift-Experimente wurden mit anti-Stat3-Antikörpern zum gezeigten Zeitpunkt durchgeführt (C). An Tyrosin phosphoryliertes Stat3 wurde durch Western-Blot-Analyse in 10 µg nukleärer Extrakte mittels anti-Phospho-Stat3-Antikörper (A und B unterer Teil der Abbildungen) nachgewiesen. Ein anti-Phospho-ERK-Antikörper wurden zum

Nachweis der Aktivierung des Ras/MAP-Kinase-Signalwegs verwendet (D Kontrolltiere und E oberer Teil hsgp80 Tiere). Zusätzlich wurde ein ERK-Kinase-Assay mit den Extrakten aus den hsgp80 Tieren durchgeführt (E unterer Teil der Abbildung).

### **3.1.2 Bestimmung der hIL-6 und hsgp80 Serumkonzentrationen vor und nach partieller Hepatektomie**

Die Stimulationsexperimente deuteten daraufhin, daß IL-6 Injektionen in die transgenen Tiere in einer mehr als 48 stündigen Aktivierung von Stat3 resultieren. Frühere Ergebnisse zeigten, daß IL-6 essentiell für die Progression der Hepatozyten durch den Zellzyklus nach partieller Hepatektomie ist (Cressman et al., 1996). In diesen Experimenten war die Stat3 Aktivierung auf die ersten Stunden nach Hepatektomie begrenzt. In dieser Phase findet der frühe G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Übergang während der Leberregeneration statt. Allerdings konnte zu späteren Zeitpunkten, während des Beginns der S-Phase keine Aktivierung von Stat3 festgestellt werden. Deshalb sollte untersucht werden wie sich die durch IL-6 induzierte verlängerte Stat3 Aktivierung auf gp130 abhängige Signalwege und insbesondere den Zellzyklus und die Regeneration der Leber auswirkt.

Die transgenen Tiere wurden dafür 3 Stunden vor partieller Hepatektomie mit 8 µg humanem IL-6 stimuliert, während als Kontrollgruppe nicht stimulierte hsgp80 Tiere dienten. Zuerst wurde die Kinetik von hIL-6 nach der Injektion, während der Regeneration mittels ELISA untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß nach der Injektion von hIL-6 ein starker Anstieg der Serumkonzentration festzustellen ist, der in einem Maximum 6 Stunden nach PH bzw. 9 Stunden nach Injektion resultiert. Anschließend erfolgt ein schneller und starker Abfall, so daß 18 Stunden nach PH bzw. 21 Stunden nach Injektion kein IL-6 mehr nachzuweisen war. In den nicht behandelten Tieren konnte über den gesamten beobachteten Zeitrahmen kein humanes IL-6 im Serum nachgewiesen werden (Abb 6).

Der hyperstimulatorische Effekt auf die gp130 abhängigen Signalkaskaden wird in den transgenen Tieren durch einen hIL-6/hsgp80 Komplex induziert. Deshalb wurde die Konzentration des durch das Transgen produzierten löslichen Rezeptors im Serum von hIL-6 behandelten und unbehandelten Tieren während der Regeneration

untersucht (Abb. 6). Die ELISA Ergebnisse zeigen einen vergleichbaren Serumspiegel in beiden Gruppen vor der PH. Nach der Operation konnte nur in den nicht hIL-6 behandelten Tieren 6 und 12 Stunden nach PH ein starker Anstieg des Serumspiegels festgestellt werden. Zu späteren Zeitpunkten nach PH sind geringfügige Variationen im hsgp80 Serumspiegel zu verzeichnen, auf die hier nicht näher eingegangen wird.

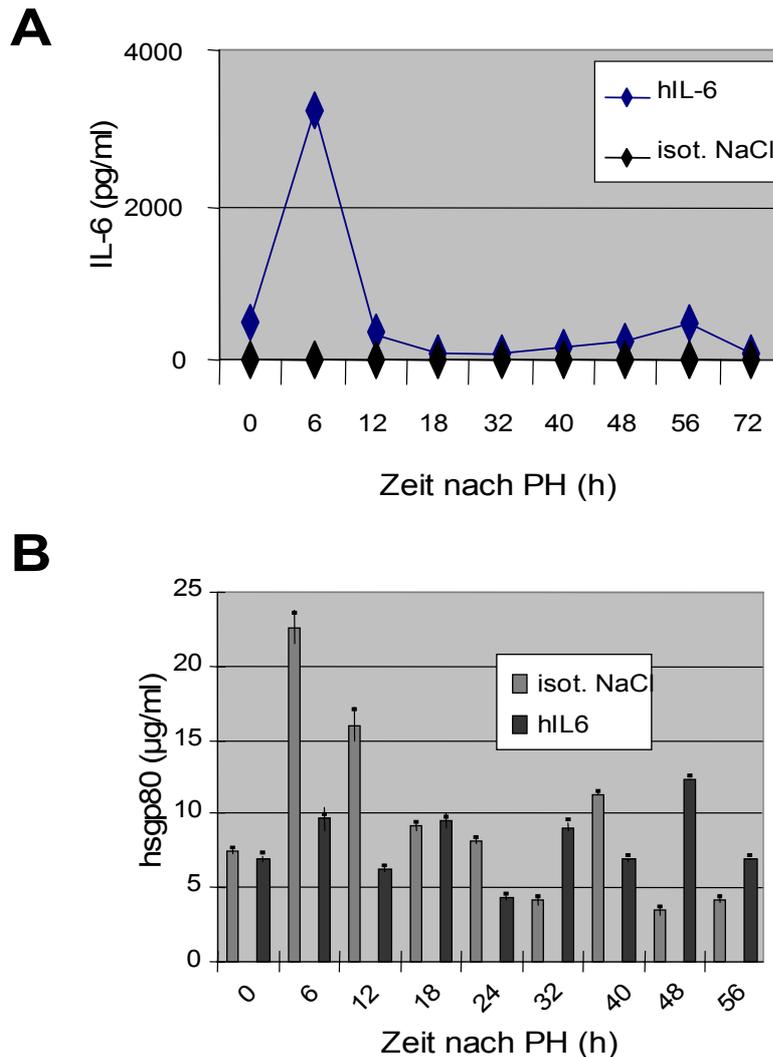


Abb 6: hIL-6 und hsgp80 Serumkonzentrationen vor und nach partieller Hepatektomie. Die hIL-6 (A) und hsgp80 (B) Serumkonzentrationen wurden in hsgp80 transgenen Tieren vor und nach 2/3 Hepatektomie mittels ELISA gemessen. Die Tiere bekamen 3 Stunden vor der Operation entweder 8 mg hIL-6 bzw. isotonische Kochsalzlösung (Kontrollgruppe).

### **3.1.3 Eine IL-6 Stimulation in hsgp80 transgenen Tieren führt auch zu einer lang anhaltenden Stat3 Aktivierung nach partieller Hepatektomie**

Um die Auswirkung der hIL-6 Stimulation im Rahmen der Regeneration auf die IL-6 abhängigen Signalwege zu untersuchen, wurden wiederum Western-Blot- und EMSA-Experimente mit nukleären Extrakten aus den Lebern von hIL-6 behandelten transgenen Tieren und unbehandelten Mäusen durchgeführt. Die Lebern waren vorher zu verschiedenen Zeitpunkten nach PH aus den Tieren entnommen worden. In den unbehandelten Tieren war die Aktivierung von Stat3 auf die ersten Stunden nach Hepatektomie beschränkt. Eine starke Phosphorylierung von Stat3 konnte bis zu 6 Stunden nach PH festgestellt werden, während danach nur noch ein sehr schwaches phosphoryliertes Stat3-Signal festgestellt werden konnte (Abb. 7). Diese Daten entsprechen den Ergebnissen einer entsprechenden EMSA Analyse (nicht gezeigte Daten).

Im Gegensatz dazu konnte in den 3 Stunden vor PH hIL-6 behandelten Tieren schon zum Zeitpunkt der Operation ein starkes Phospho-Stat-3 Signal nachgewiesen werden. In diesen Mäusen war Phospho-Stat-3 bis zu 48 Stunden nach partieller Hepatektomie nachzuweisen. Die Daten bezüglich phosphoryliertem Stat3 im Nukleus entsprachen auch hier den Bindungsstudien von aktivem Stat3 an das Konsensus-Oligo im EMSA-Assay.

Die Kontrolltiere zeigten während der Regeneration nach PH zuerst eine Abnahme von phosphoryliertem ERK. Nach 32 Stunden erfolgte ein starker Anstieg von Phospho-ERK, der nach 48 Stunden wieder abfiel. Eine davon abweichende Kinetik zeigte sich bei den IL-6 stimulierten Mäusen. Auch hier konnte anfangs ein Abfall von aktivem ERK festgestellt werden. 48 Stunden nach PH erfolgte ein Anstieg und eine noch stärkere Aktivierung 72 Stunden nach PH. Dies entspricht einer verspäteten und länger andauernden Aktivierung der Kinase in hsgp80 Tieren nach IL-6 Gabe.

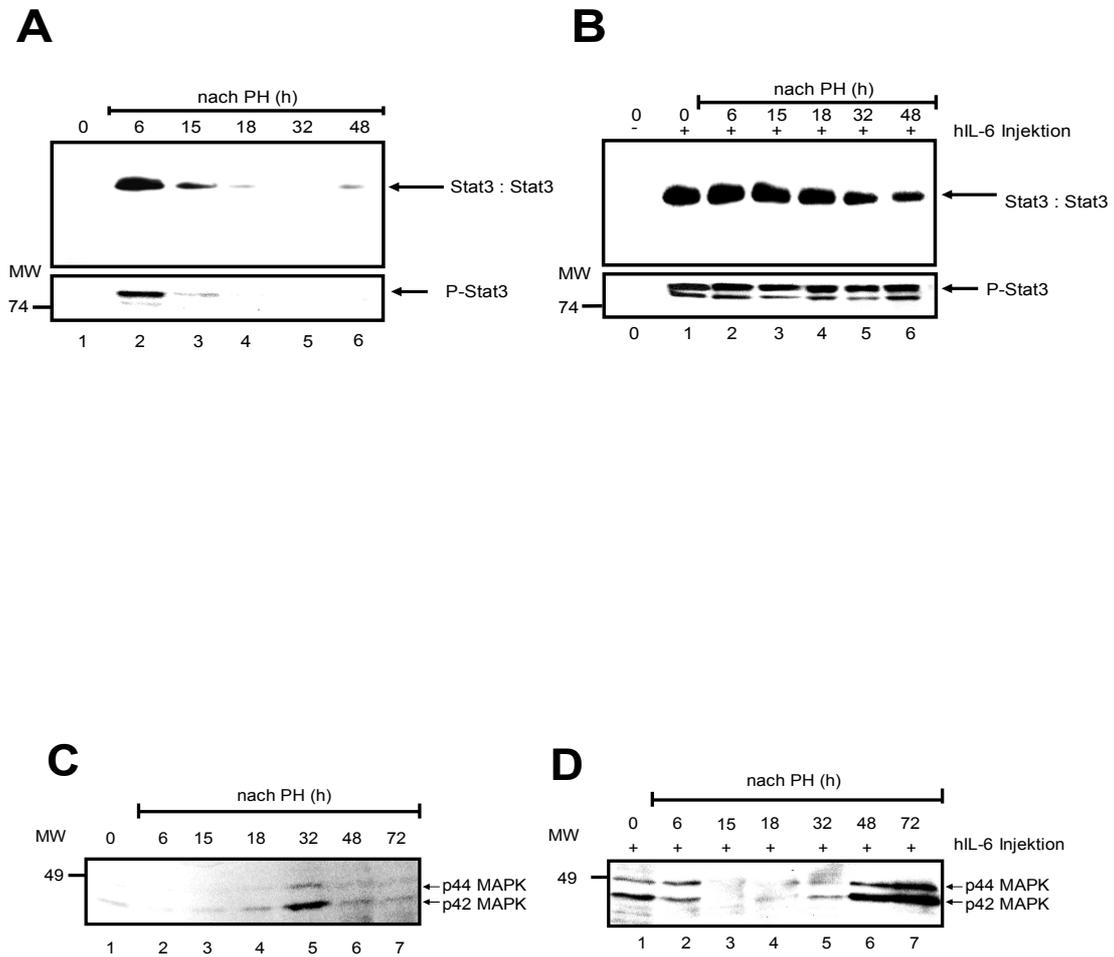


Abb. 7: Die IL-6 Stimulation führt in hsgp80 transgenen Tieren nach partieller Hepatektomie zu einer lang anhaltenden Stat3 Aktivierung. Den transgenen Tieren wurde 8 µg hIL-6 intraperitoneal 3 Stunden vor der Operation injiziert. Kontrolltieren wurde anstelle von hIL-6 isotone Kochsalzlösung verabreicht. Die Stat3-DNA-Bindung wurde durch Gel-shift-Experimente vor und nach partieller Hepatektomie sowohl in der hIL-6 behandelten- als auch in Kontrolltieren untersucht. Für diese Untersuchung wurden nukleäre Leberextrakte von den bezeichneten Zeitpunkten sowie ein Stat3 Konsensus-Oligonukleotid verwendet (A und B oberer Teil der Abbildung). Die Pfeile deuten die Stelle für den Stat3 spezifischen Komplex an. Die Expression von Phospho-Stat-3 (A und B unterer

Teil der Abbildung) und Phospho-ERK (C und D) wurde durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Die Zeitpunkte als auch die Position des phosphorylierten Stat-3 und ERK sind angedeutet. Die gleichmäßige Beladung der Proteingele wurde durch hier nicht gezeigte Coomassie Gele überprüft.

### **3.1.4 Die Stimulation mit hIL-6 führt zu einer Verzögerung und Reduzierung der Zellproliferation in hsgp80 transgenen Tieren nach PH.**

Da Unterschiede in der Aktivierung von gp130 abhängigen Signalwegen zwischen beiden Tiergruppen entdeckt wurden, sollte als nächstes die Auswirkung dieser Veränderung auf die Fortsetzung der S-Phase analysiert werden. Mittels BrdU-Assays wurde der Zellzyklus untersucht (Abb. 8). Es wurden massive Unterschiede im Einbau von BrdU bei den hIL-6 behandelten transgenen Mäusen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt. In den unbehandelten Tieren wurde 32 Stunden nach PH eine Steigerung des BrdU Einbaus nachgewiesen. Der maximale Einbau erfolgte 48h nach der Operation. Zu diesem Zeitpunkt waren ungefähr 38 % der Zellen BrdU positiv. Nach 48 Stunden verringerte sich der BrdU Einbau wieder und erreichte 72h nach PH wieder ungefähr das Ausgangsniveau.

Die hIL-6 stimulierten Mäuse zeigten hingegen zuerst 48 Stunden nach PH einen Anstieg im BrdU Einbau. Zu diesem Zeitpunkt war der Einbau 40% unter dem der unstimulierten Gruppe. Auch zu den späteren Zeitpunkten lag die BrdU Einbaurrate deutlich unter der der Kontrollgruppe.

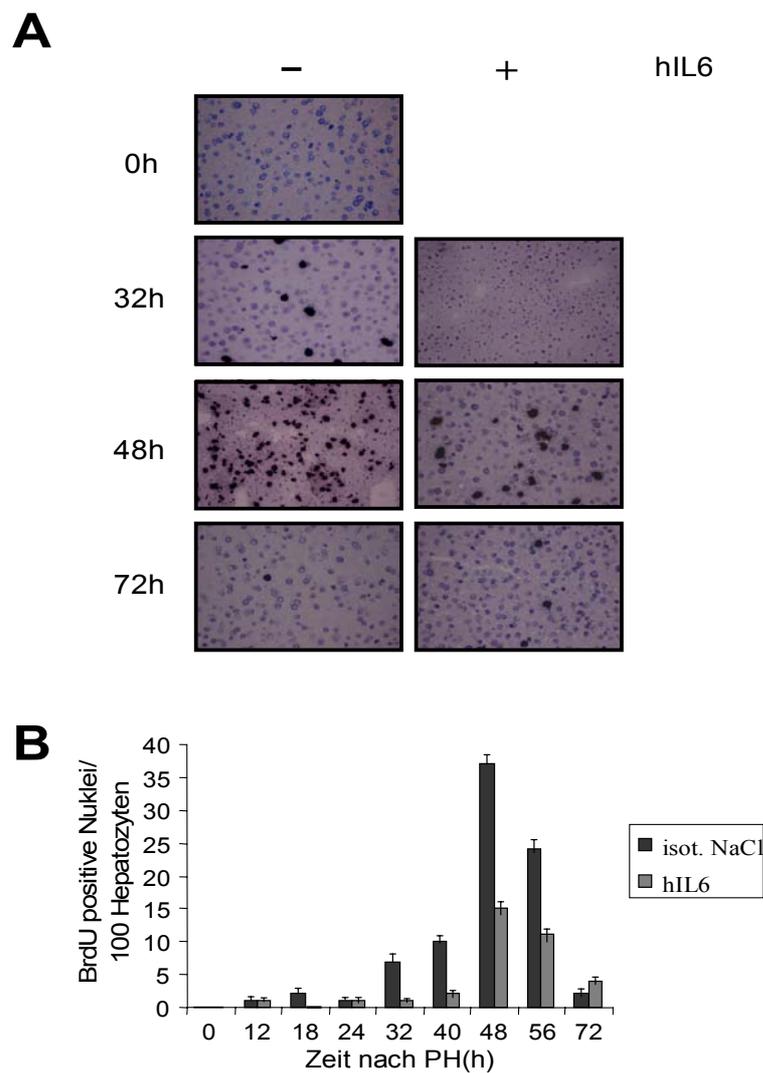


Abb. 8: Die hIL-6 Behandlung verzögert und inhibiert die DNA-Synthese nach partieller Hepatektomie. Die Mäuse wurden zu den bezeichneten Zeitpunkten nach Hepatektomie getötet. Zwei Stunden vor der Leberentnahme wurden den Tieren BrdU intraperitoneal injiziert. BrdU positive Zellen wurden in Kryoschnitten nachgewiesen. (A) Kryoschnitte von verschiedenen bezeichneten Zeitpunkten nach PH aus der hIL-6 behandelten (+) und der Kontrollgruppe (-) werden gezeigt. (B) Es wurden BrdU positive Nuklei pro 100 Hepatozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach PH gezählt gezeigt für ( ) ohne IL-6 Behandlung und ( ) mit hIL-6 Behandlung.

### **3.1.5 Die Stimulation von hsgp80 transgenen Mäusen mit hIL-6 verzögert die Expression von Zyklin A und E nach PH**

Zur weiteren Aufklärung der Veränderungen im Zellzyklus während der Leberregeneration wurde die Expression der Zellzyklus Marker Zyklin A und E untersucht. Zyklin E wird während des G<sub>1</sub>/S-Phaseübergangs aktiviert und das Zyklin A ist während der S-Phase aktiv. Es ist bekannt, daß nach der Aktivierung des Zyklins E der Durchgang durch den Zell Zyklus unabhängig von dem Stimulus von extrazellulären Wachstumsfaktoren abläuft (Ekholm et al., 2001). In unstimulierten Mäusen konnte eine maximale Aktivierung des Zyklins E 32 und 48 Stunden nach PH gefunden werden. Die früheste Expression konnte nach 24 Stunden nachgewiesen werden. Zu späteren Zeitpunkten verringerte sich die Expression des Zyklins wieder (Abb. 9).

In den hIL-6 behandelten Tieren stieg Zyklin E zuerst 32 Stunden nach Hepatektomie an und erreichte eine maximale Aktivierung 48 Stunden nach PH, wobei aber das Expressionsniveau geringer als in den Kontrolltieren war. 72 Stunden nach der Operation fiel die Aktivierung wieder ab, die Stärke der Proteinbande war zu diesem Zeitpunkt höher als in der Vergleichsgruppe (Abb. 9).

Zyklin A ist ein Marker der S-Phase. Positive Signale wurden 32 Stunden nach PH in den nukleären Extrakten von unstimulierten Tieren gefunden. Die maximale Expressionsstärke wurde 48 Stunden nach PH gefunden. Danach fiel die Aktivierung von Zyklin A wieder ab, war aber auch zum 72 Stunden-Zeitpunkt noch nachweisbar (Abb.9). In den behandelten hsgp80 Mäusen konnte zuerst 40 Stunden nach der Operation eine Aktivierung mit einer maximalen Induktion 48 Stunden nach PH. Auch in diesen Tieren fiel der Zyklin A-Niveau danach ab (Abb.9) festgestellt werden.

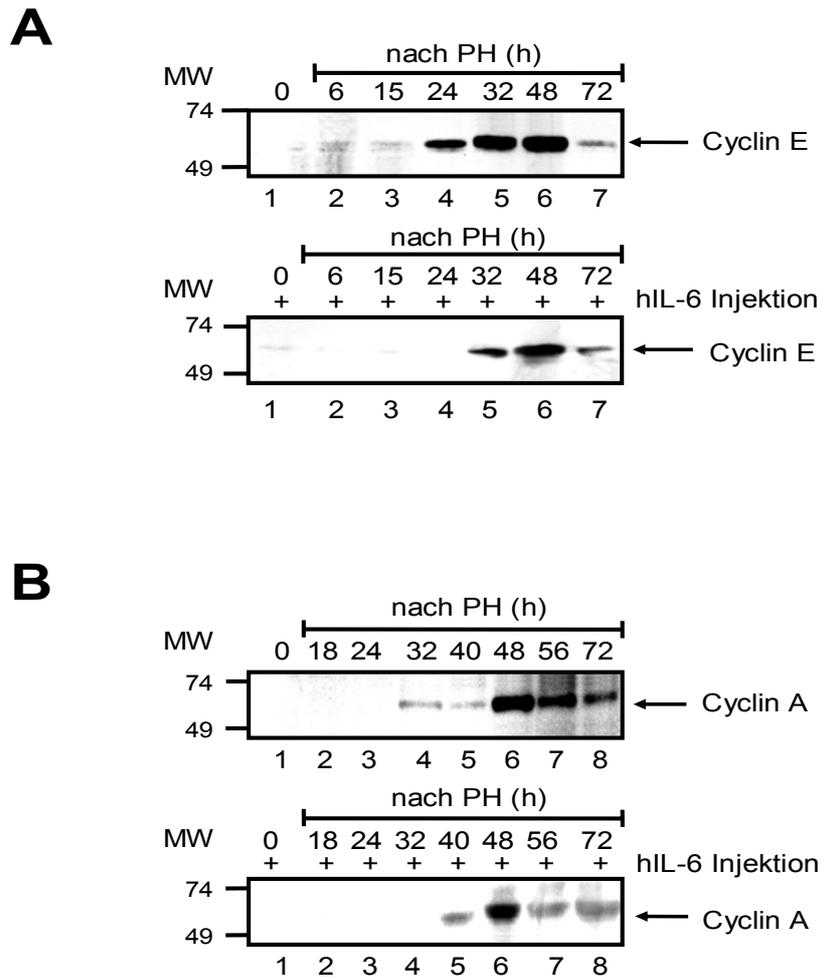


Abb. 9: IL-6 behandelte Tiere zeigen gegenüber unbehandelten Tieren eine unterschiedliche Kinetik in der Zyklin A und E Expression. Die Zyklin E (A) und A (B) Expression wurde mit Western-Blot-Analysen von nukleären Leberextrakten in der Kontrollgruppe (oberer Teil der Abbildung) und in der hIL-6 behandelten Gruppe (unterer Teil der Abbildung) untersucht. Die Zeitpunkte nach Hepatektomie in beiden Gruppen und die Position der Zyklin A und E Signale sind gekennzeichnet. Der Proteinabgleich erfolgte über eine Coomassie Färbung eines identisch beladenen Gels.

### 3.1.6 Die Stimulation mit hIL-6 in den hsgp80 transgenen Tieren führt zu einer verstärkten p21 Expression

Es sind eine Reihe von Zellzyklus Inhibitoren beschrieben, die die Hepatozytenproliferation nach partieller Hepatektomie während der Regenerationsphase beeinflussen. So ist bekannt, daß in p21 überexprimierenden, transgenen Mäusen die Proliferation in der Leber nach PH reduziert ist. Deshalb

wurde die Expression der Inhibitoren p21 und p27 auch in den stimulierten hsgp80 transgenen Mäusen untersucht.

Die p21 Expression wurde auf der Proteinebene mittels Western-Blot-Analyse von nukleären Extrakten aus der Leber von hIL-6 stimulierten und unstimulierten hsgp80 Mäusen nach partieller Hepatektomie ermittelt (Abb. 10). Die unbehandelten Mäuse zeigten eine schwache basale Expression zum Zeitpunkt vor der partiellen Hepatektomie. Nach Durchführung der Operation konnte zuerst ein Abfall der p21 Expression bis 18 Stunden nach PH festgestellt. 18 Stunden nach PH war p21 nicht nachweisbar. Zu späteren Zeitpunkten konnte p21, allerdings mit einer nicht mehr als basalen Expression, wieder detektiert werden.

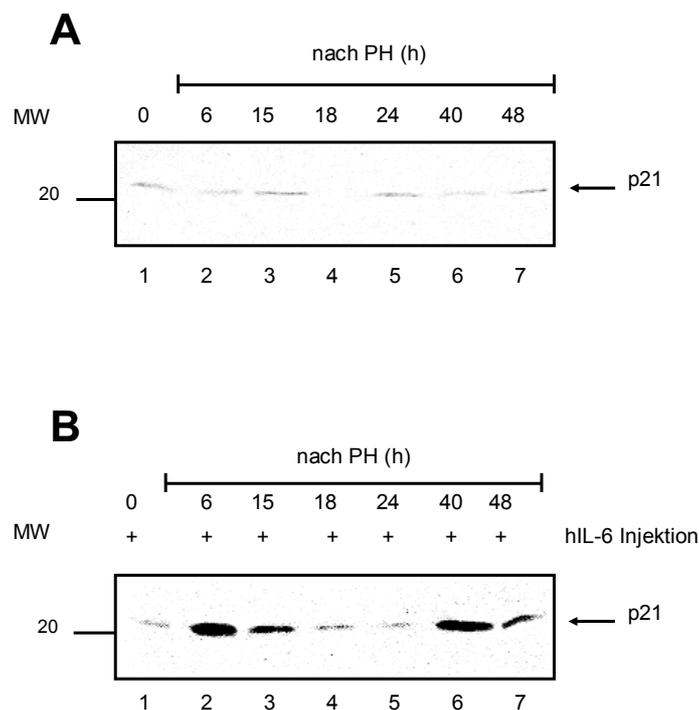


Abb. 10: Die IL-6 Behandlung korreliert mit einer Erhöhung der p21 Expression nach PH. Die Expression des PKI Inhibitors p21 (A und B) wurde durch Western-Blot-Experimente in der Kontrollgruppe (A) und der IL-6 behandelten Gruppe (B) untersucht. Für die Untersuchung wurden nukleäre Leberextrakte zu den unterschiedlich untersuchten Zeitpunkten präpariert. Die Membran wurde mit einem anti-p21-Antikörper behandelt.

Im Gegensatz zu den nicht stimulierten Mäusen zeigten die hIL-6 behandelten hsgp80 Tiere 6h nach PH einen deutlichen Anstieg der p21 Proteinmenge, der danach wieder abfiel. Ein zweites Maximum in der Expression von p21 konnte zum Zeitpunkt 40h nach PH ermittelt werden.

Die Expression des Zellzyklus Inhibitors p27 wurde auf RNA-Ebene durch Northern-Blot-Experimente nachgewiesen, da zum Nachweis des Proteins kein geeigneter Antikörper verfügbar war. Die unstimulierten Tiere zeigten eine leichte Steigerung der mRNA-Expression 6 Stunden nach PH, die danach wieder auf basale Expressionsstärke zurückfiel. 56h nach der Operation konnte erneut eine leichte Steigerung der Expressionsstärke festgestellt werden.

In den stimulierten Mäusen konnte ein ähnlicher Verlauf der mRNA-Expression von p27 nachgewiesen werden. Allerdings war der Anstieg in den mit hIL-6 induzierten Tieren deutlich stärker (Abb. 11).

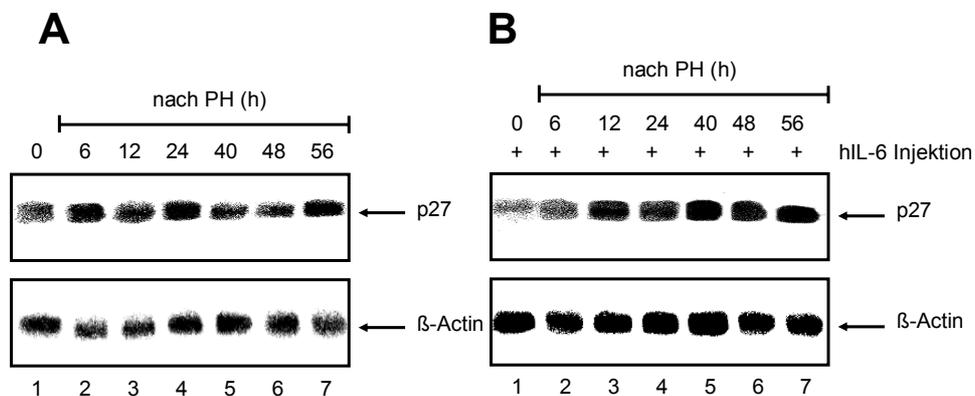


Abb. 11: Die IL-6 Behandlung hat auf die mRNA Expression von p27 keinen signifikanten Einfluß. Die mRNA Expression wurde mittels Northern-Blot in den unbehandelten Kontrollen (A) und den hIL-6 behandelten Tieren (B) zu den bezeichneten Zeitpunkten untersucht. Ein gleichmäßiger Transfer der mRNA wurde durch den Nachweis von  $\beta$ -Actin als konstitutiv exprimiertes „housekeeping gene“ nachgewiesen.

## **3.2 Mx-Cre/gp130 loxP Mäuse:**

### **3.2.1 Deletion des Exon 16 durch plpC in den gp130loxP/mx-Cre Mäusen**

Da eine konventionelle gp130 Knock out Maus embryonal lethal ist, wurde für die weiteren Versuche eine konditionelle gp130 Knock out Maus genutzt. Da der gp130 Rezeptor für die Weiterleitung von Signalen von IL-6 aber auch einer Reihe anderer Zytokine (s. Einleitung) essentiell ist, ist es von großem Interesse die Auswirkung eines Fehlens dieses Rezeptors bei der Leberregeneration zu untersuchen. Bei den verwendeten Mäusen ist das Exon 16 von zwei loxP Sequenzen flankiert (Abb. 12) (Betz et al., 1998). Das Exon 16 kodiert für die Transmembrandomäne des gp130 Rezeptors. Ohne diese Domäne kann kein membranständiger Rezeptor mehr gebildet werden. Bei den loxP Sequenzen handelt es sich um eine 34 Basen umfassende Erkennungssequenzen für die DNA-Rekombinase des Bakteriophagen P1. Ein DNA-Abschnitt der von zwei loxP Sequenzen eingegrenzt wird, wird von der DNA-Rekombinase entfernt. Die Expression der Bakteriophagen Rekombinase wird bei den hier verwendeten Mäusen durch Interferon  $\alpha$  induziert. Das Transgen der Rekombinase steht unter der Kontrolle des Mx-Promotors (Alonzi et al., 2001; Kuhn et al., 1995). IFN  $\alpha$  aktiviert diesen Promotor, so daß das Transgen gebildet werden kann. Bei den hier vorgenommenen Untersuchungen wurde den Tieren doppelsträngige synthetisch hergestellte plpC RNA intraperitoneal injiziert. Die doppelsträngige RNA simuliert eine Virusinfektion und induziert dadurch in Mäusen die endogene Ausschüttung von Interferon alpha.

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden Tiere des Genotyps gp130 Exon 16 loxP / Exon 16 loxP Mx-Cre verwendet, die einer entsprechenden Zuchtlinie entstammten. Zur Identifizierung dieser Tiere wurden PCR-Genotypisierungen mit geeigneten Primern durchgeführt (Abb. 12). Um die Ergebnisse abzusichern wurde jede PCR mindestens zweimal durchgeführt.

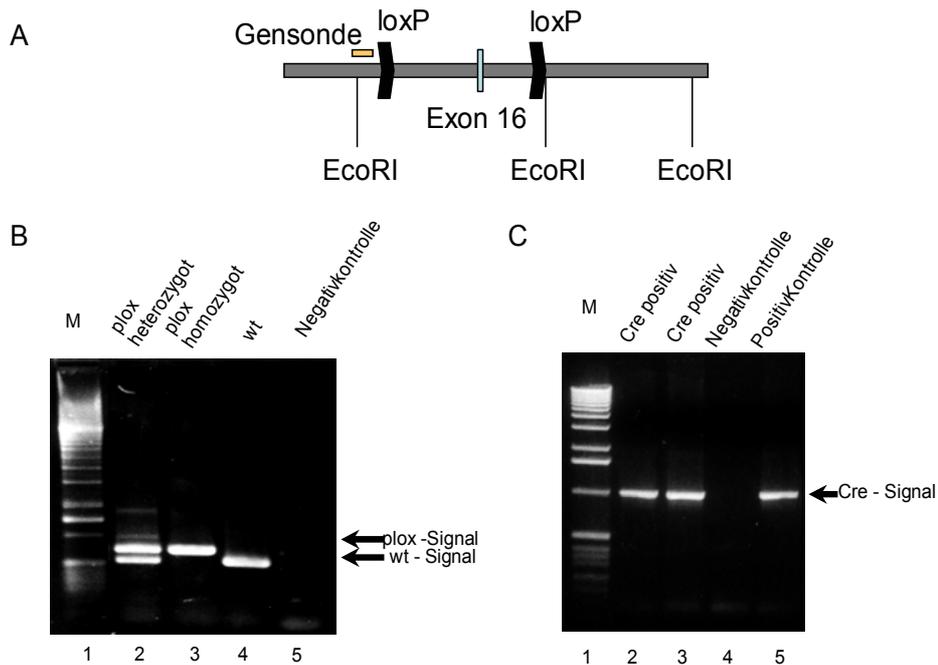


Abb. 12: Charakterisierung von Cre-transgenen und gp130-loxP homozygoten Mäusen mittels PCR-Analyse. (A) Schematische Darstellung des mit loxP-Sequenzen flankierten Exons 16. (B) PCR Vergleich mit genomischer DNA von gp130 loxP/MxCre und Wildtyp-Tieren. (C) Nachweis des für die Rekombinase kodierenden Cre-Transgens.

Für Experimente verwendete Tiere wurden zusätzlich durch eine Southern-Blot-Analyse analysiert. Es wurden verschiedene Konzentrationen von plpC in die gp130loxP(+)/Mx-Cre(+) Tiere intraperitoneal injiziert, um die Deletion des für die Transmembrandomäne des gp130 Rezeptors kodierende Exon 16 in der Leber zu untersuchen. 6 Tage nach der Injektion wurden die Lebern aus den Mäusen entnommen und DNA wurde aus der Leber isoliert. Nachdem die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym EcoRI über 18 Stunden behandelt wurde, erfolgte eine Southern-Blot-Analyse. Es konnte gezeigt werden, daß schon eine Verabreichung von 20µg plpC pro 20g Maus zu einer effizienten über 90%-igen Deletion des Exon 16 im gp130 Genlokus führte. Mit höheren Dosen von 80 µg bzw. 120 µg plpC pro 20 g Maus konnte eine über 95%-ige Deletionseffizienz erreicht werden (Abb. 13).

Als nächstes wurde die Folge der durch Injektion von 80µg erzeugten Deletion des Exon 16 untersucht. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach plpC Induktion wurden die Tiere mit 10µg IL-6 pro Maus stimuliert. 3 Stunden nach Stimulation wurde die Leber den Tieren entnommen und nukleäre Proteinextrakte aus der Leber gewonnen. Durch eine EMSA Analyse wurde die Aktivierung von Stat3 untersucht.

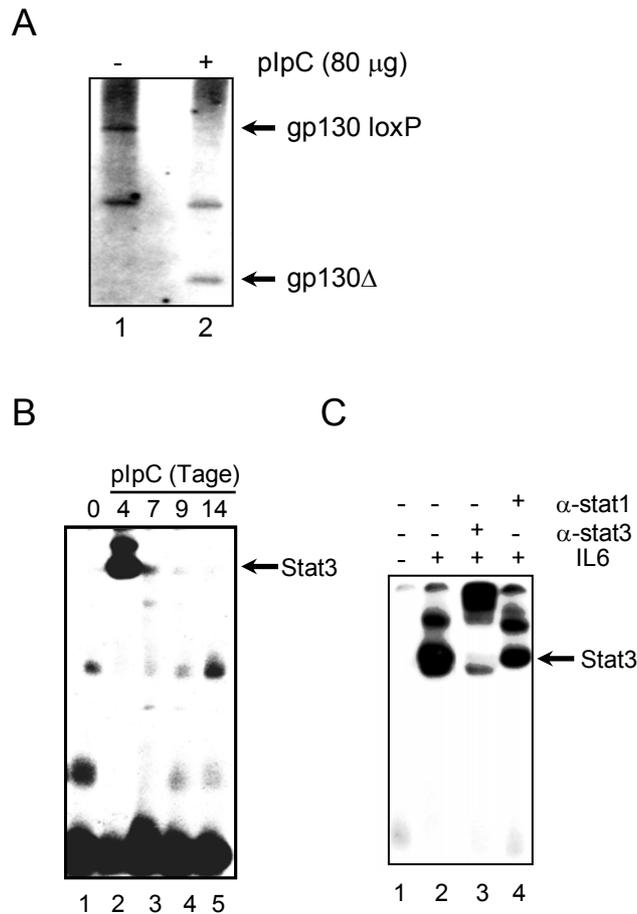


Abb. 13: Die Induktion mit plpC führt zu einer effizienten Deletion von gp130. (A) Gp130loxP (+/+)/ MxCre (+) und gp130 (+/+)/ MxCre (-) Mäuse wurden mit 80 µg plpC pro 20 g Maus stimuliert. 3 Tage nach Stimulation wurde DNA aus der Leber isoliert und eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt. Die Position des gp130 loxP und des gp130 loxP Exon 16 deletierten Signals sind gekennzeichnet. (B) Es wurden gp130 loxP (+/+)/ MxCre (+) Tiere mit 80 µg plpC behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der plpC Induktion, wurden die Tiere mit 10 µg IL-6 pro Maus stimuliert. 3 Stunden nach der Stimulation wurden Leberextrakte hergestellt, die für Gel-Shift-Analysen mit einem radioaktiv markierten Stat-Konsensus-Oligo eingesetzt wurden. (C) Für die Super-Shift Experimente wurden Leberextrakte von 4 Tagen nach plpC induzierten Mäusen mit einem Anti-Stat-3 und einem Anti-Stat-1 Antikörper inkubiert. Die Position von Stat3 ist gekennzeichnet.

4 Tage nach Verabreichung von plpC konnte in den IL-6 behandelten Mäusen noch eine starke Aktivierung von Stat3 im Vergleich zu unstimulierten Tieren gezeigt werden (Abb. 13). Super-Shift-Experimente bestätigten, daß der geformte Komplex vornehmlich aus Stat3 Homodimeren bestand (Abb. 13). Zu späteren Zeitpunkten nach plpC Gabe nahm die Stärke der Aktivierung von Stat3 ab und erreichte nach 9 Tagen das Hintergrundniveau (Abb. 13)

### **3.2.2 Die Aktivierung von Stat3 ist in den gp130loxP/Mx-Cre Mäusen blockiert**

Um die Auswirkung von gp130 abhängigen Signalwegen auf die Leberregeneration zu untersuchen, wurden gp130loxP(+/+)/Mx-Cre(+) sowie Kontrolltiere des Genotyps gp130loxP(+/+)/Mx-Cre(-) Mäuse mit 80µg plpC pro 20g Tier behandelt und nach 9 Tagen wurden partielle Hepatektomien an den Tieren durchgeführt. Zuerst wurden die IL-6 Serumspiegel in beiden Gruppen untersucht. Beide Gruppen zeigten 3 Stunden nach PH einen Anstieg in der IL-6 Expression (Abb. 14). Der Spitzenwert für IL-6 im Serum wurde in den gp130loxP Mäusen 6 Stunden nach PH erreicht, während in den Knock out Mäusen dieser Wert erst nach 12h erreicht wurde und dabei eine ungefähr doppelt so starke Konzentration zeigte. Auch zu den späteren Zeitpunkten nahm die Serumkonzentration in den Knock out Tieren langsamer ab (Abb. 14). Nach partieller Hepatektomie konnte bezüglich der Überlebensrate kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden werden.

Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Stat-3 und Stat-1 erfolgt durch die Dimerisierung des gp130 Rezeptors. Deshalb wurde die Komplexbildung der Stat-Faktoren durch EMSA Analyse in beiden Tiergruppen untersucht. In den Kontrolltieren konnte schon 1 Stunden nach der Operation ein Stat-Komplex nachgewiesen werden, der bis 12 Stunden post PH bestand hatte (Abb. 15). In den gp130loxP(+/+)/Mx-Cre(+) Mäusen konnte wie erwartet über den gesamten beobachteten Zeitrahmen keine Aktivierung von Stat3 gefunden werden (Abb. 15).

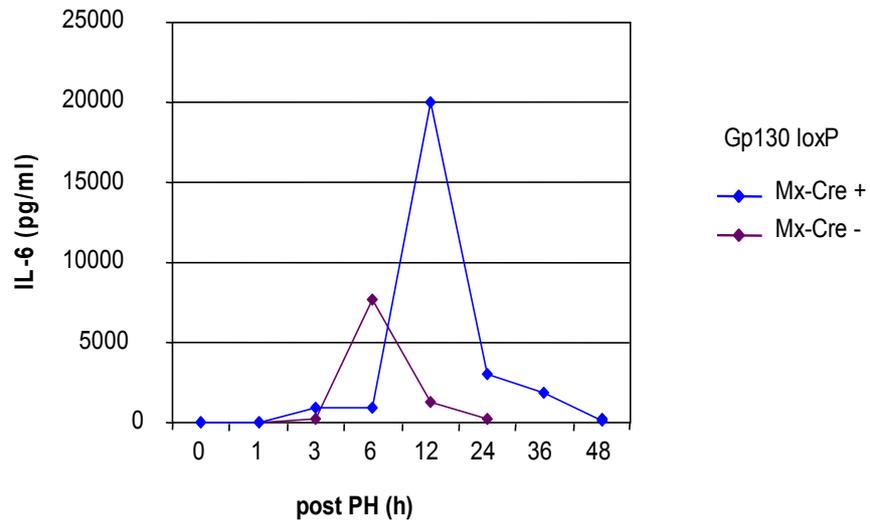


Abb. 14: Messung der IL-6 Serumkonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten nach partieller Hepatektomie. Die Serumwerte wurden sowohl in gp130 loxP (+/+)/ MxCre positiven und negativen Mäusen gemessen.

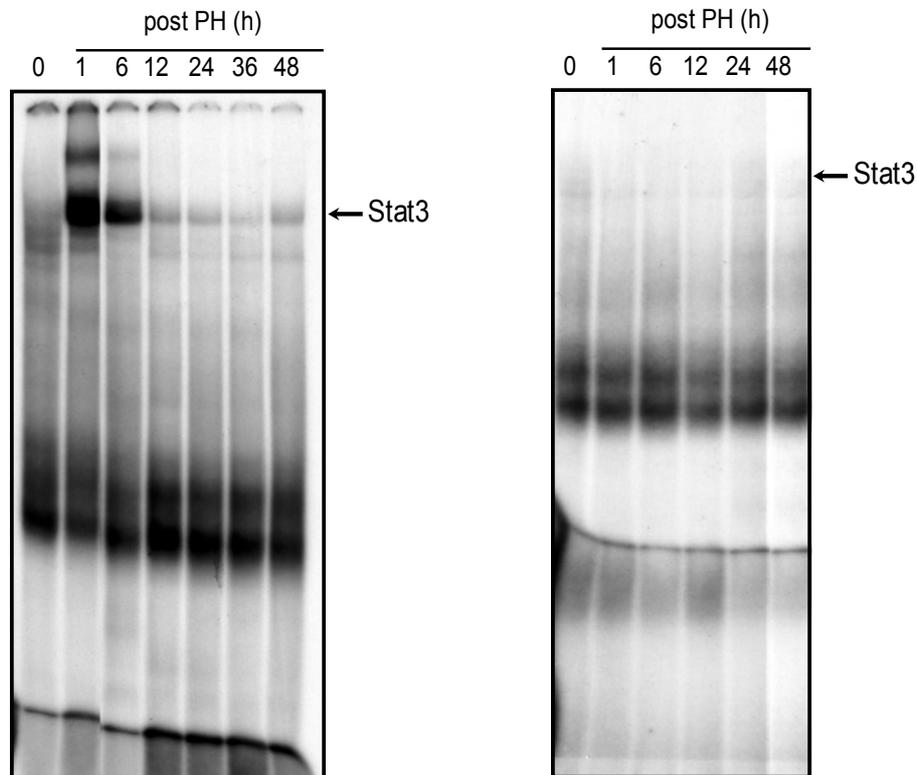


Abb. 15: Die Stat3 Aktivierung in den gp130 deletierten Mäusen ist nach partieller Hepatektomie blockiert. Es wurden Gel-Shift-Experimente mit einem radioaktiv markiertem Stat-Konsensusoligonukleotid und Proteinextrakten aus der Leber durchgeführt. Die Ergebnisse für gp130 loxP (+/+)/ MxCre positive und negative Tiere werden gezeigt. Die Position des Stat3 Komplexes ist gekennzeichnet.

### 3.2.3 Die Aktivierung von Immediate early Genen ist in den konditionalen Knock out Tieren inhibiert

Für eine Reihe von sehr schnell aktivierten Genen, wie NFkB und c-Jun konnte gezeigt werden, daß ihre Aktivierung mit dem Ablauf der Leberregeneration korreliert (Morello et al 1990, Cressmann et al 1994). Deshalb wurde die Aktivierung von NFkB und AP-1 in beiden Gruppen während des Regenerationsprozesses nach Hepatektomie durch EMSA Analyse untersucht.

In den Kontrollmäusen konnte zuerst eine Aktivierung von NF $\kappa$ B 1h nach der Operation festgestellt werden, die bis zum Zeitpunkt 36h nach PH detektierbar war. Dabei konnte eine vornehmliche Aktivierung des p50 Homodimers gegenüber der Aktivierung des p65 Homo- bzw. p50/p65 Heterodimers durch Super-Shift-Analyse gezeigt werden (Abb. 16). Im Gegensatz dazu zeigten die konditional inaktivierten gp130<sup>-/-</sup> Mäuse eine NF $\kappa$ B Komplexbildung von 12 Stunden bis einschließlich 72 Stunden nach partieller Hepatektomie. Hier konnte deutlich eine Präferenz für die Bildung eines p65 Homodimers nachgewiesen werden (Abb. 16).

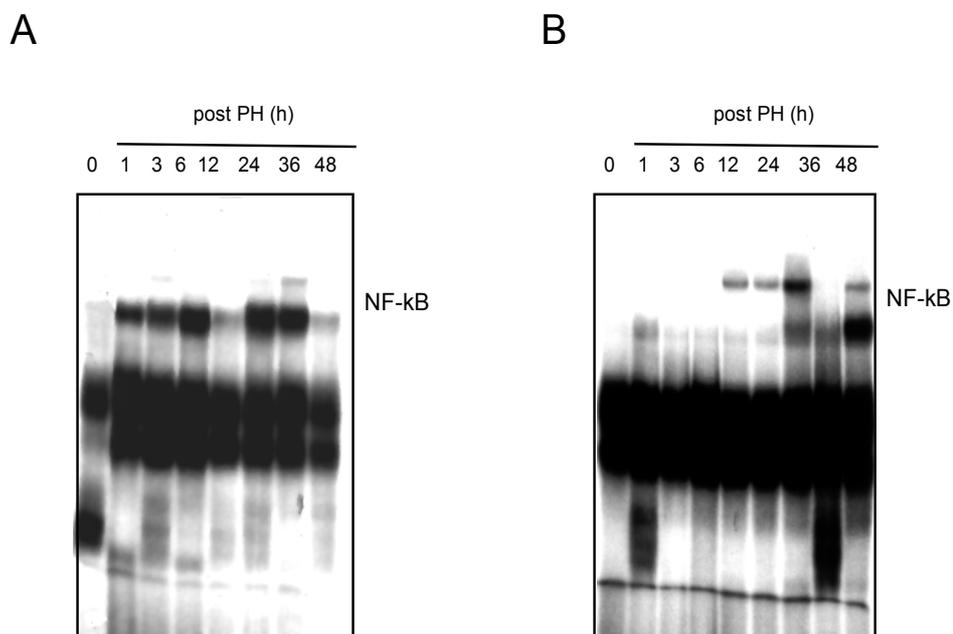


Abb. 16: Die Aktivierung von NF $\kappa$ B ist in den gp130 Knock out Tieren verzögert. Es wurden Gel-Shift-Experimente mit Proteinextrakten aus der Leber von gp130 loxP (+/+)/ MxCre negativen (A) und positiven (B) Mäusen. Die nukleären Leberextrakte wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach partieller Hepatektomie hergestellt.

Bei dem Vergleich der AP-1-Aktivierung zwischen beiden Gruppen zeigten die Kontrollen eine erste Aktivierung 1 Stunde nach PH, die bis 36 Stunden nach PH nachweisbar war. Zu späteren Zeitpunkten verringerte sich der Nachweis von AP-1, bis kein Unterschied mehr zu der Stärke bei nicht operierten Tieren festzustellen war

(Abb. 17). In den gp130 deletierten Mäusen war ein AP-1 Komplex erst nach 36 Stunden post Hepatektomie nachweisbar.

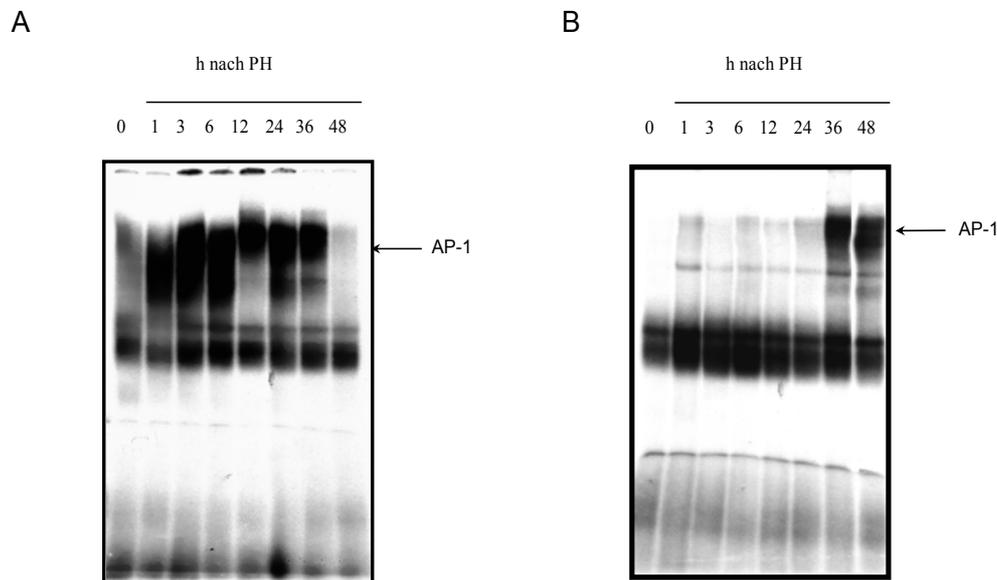


Abb. 17: Die Aktivierung von AP-1 ist nach partieller Hepatektomie in gp130 deletierten Tieren verzögert. Es wurden Gel-Shift-Analysen mit Proteinextrakten aus der Leber von Kontrolltieren (A) und gp130 loxP (+/+)/ MxCre (+) Tieren durchgeführt.

### 3.2.4 Nachweis der Zellproliferation in der Leber während der Regenerationsphase nach partieller Hepatektomie

Da starke Unterschiede in der Aktivierung von Stat3, NFkB und AP-1 zwischen den Kontrolltieren und den gp130(+)/Mx-Cre(+) Mäusen festgestellt werden konnte, sollte die Auswirkung dieser Unterschiede auf die Regeneration der Leber untersucht werden. Dafür wurde der BrdU Einbau in die DNA, als Nachweis für die DNA Synthese nach PH, ermittelt.

In der Kontrollgruppe ergab sich eine maximale Anzahl von durchschnittlich 39 BrdU positiven Zellen pro 100 (Abb. 18). Danach nahm diese Anzahl wieder ab. Auch die gp130 deletierten Mäuse zeigten den maximalen Einbau 48 Stunden nach partieller

Hepatektomie. In dieser Gruppe konnten 31% positive Nuklei nachgewiesen werden (Abb. 18). Da die Standardabweichung innerhalb und unterhalb der betrachteten Tiere sich in beiden Gruppen überlappte, ist der beobachtete Unterschied in der Proliferationsrate nicht signifikant.

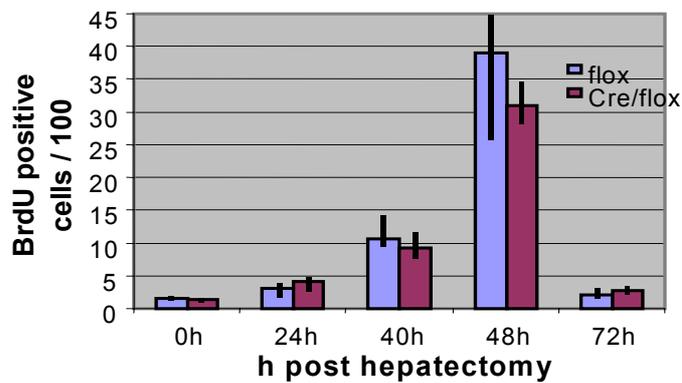
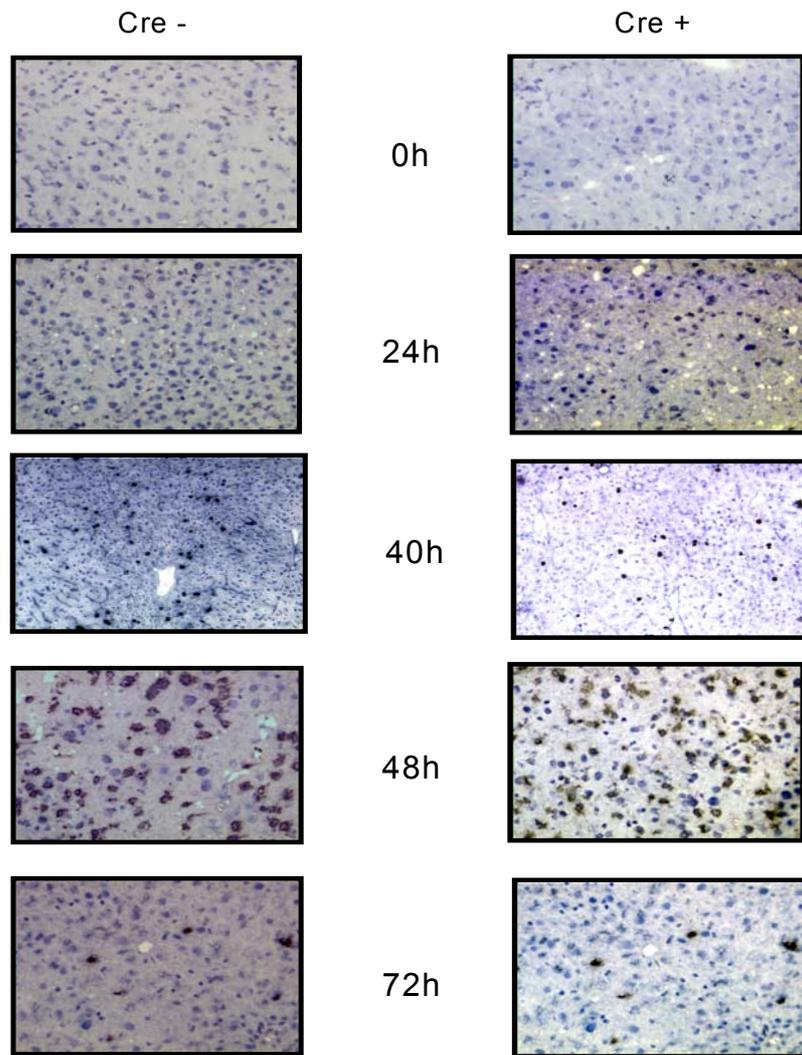
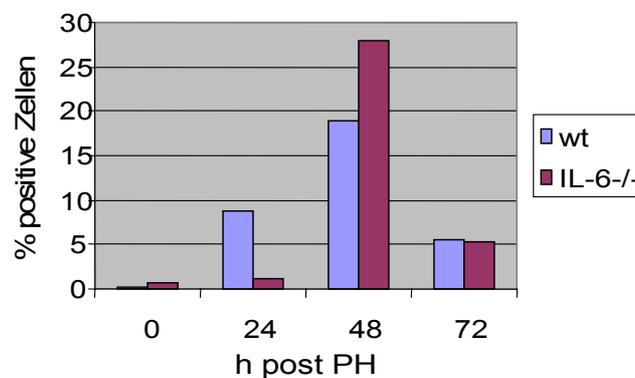
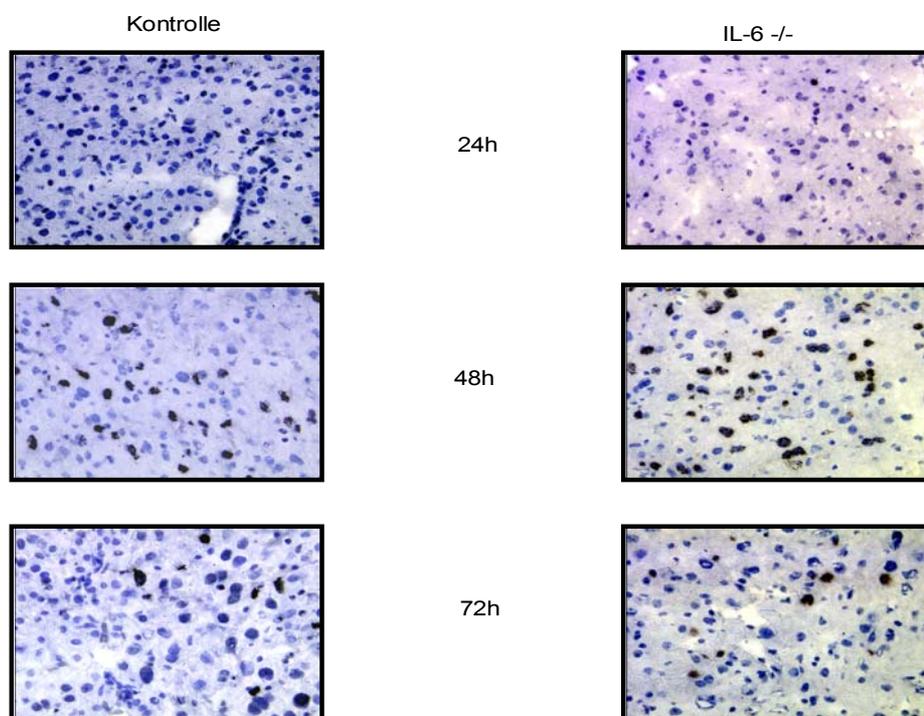


Abb. 18: Untersuchung der DNA Syntheserate in gp130 loxP MxCre Tiere nach partieller Hepatektomie.

In dieser Abbildung sind von beiden Versuchsgruppen Kryoschnitte zu sehen, an denen eine BrdU Untersuchung durchgeführt wurde. Die Schnitte wurden von Lebern, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach partieller Hepatektomie entnommen wurden, gemacht. Die Auswertung von verschiedenen untersuchten Lebern ist aufgeführt.

Auf Grund dieses nicht erwarteten Ergebnisses im Vergleich zu den publizierten Daten zu IL-6/- Mäusen von Cressman (1996), wurden auch partielle Hepatektomien an IL-6/- Mäusen mit dem genetischem NMRI-Hintergrund durchgeführt. Dabei konnte im Gegensatz zu den publizierten Daten (Cressman et al., 1996) kein signifikanter Unterschied im BrdU Einbau nach 2/3 Hepatektomie zwischen den Knock out Tieren und den NMRI Kontrollmäusen festgestellt werden (Abb. 19).



### **3.2.5 Die Regulation der Zell Zyklus Marker Zyklin E und A ist in den gp130loxP(+/+)/Mx-Cre(+) verändert**

Die Zykline sind Proteine die sequenziell während des Durchlaufens des Zell Zyklus aktiviert werden. Zyklin E ist während des G<sub>1</sub>/S-Phaseübergangs aktiv, während das Zykin A vornehmlich während der S-Phase aktiv ist. Die Expression dieser beiden Zykline wurde mittels Western-Blot-Analyse auf Proteinebene untersucht.

In den Kontrolltieren konnte 12 Stunden nach PH Zyklin E detektiert werden. Danach wurde eine Steigerung der Expression bis zum Zeitpunkt 48 Stunden nach partieller Hepatektomie nachgewiesen. Zu späteren Zeitpunkten verringerte sich das detektierbare Proteinsignal wieder (Abb. 20).

Die induzierbaren Knock out Tiere zeigten eine leicht veränderte Zyklin E Expression. Das Zyklin war erst 24 Stunden nach Operation festzustellen, stieg dann stark bis zum 48 Stunden-Zeitwert an und fiel nachfolgenden wieder ab.

Die Kontrollen zeigten bezüglich der Zyklin A Expression zuerst ein Signal nach 40 Stunden, das danach in der Intensität nachließ. In den gp130loxP(+/+)/Mx-Cre(+) Tieren erfolgte erst 48 Stunden nach Hepatektomie eine nachweisbare Induktion (Abb. 20).

Allerdings scheinen die leichten Unterschiede in der Aktivierung der Zykline keinen signifikanten Einfluß auf die Proliferation im Sinne der BrdU Analyse (s. 3.2.4) zu haben.

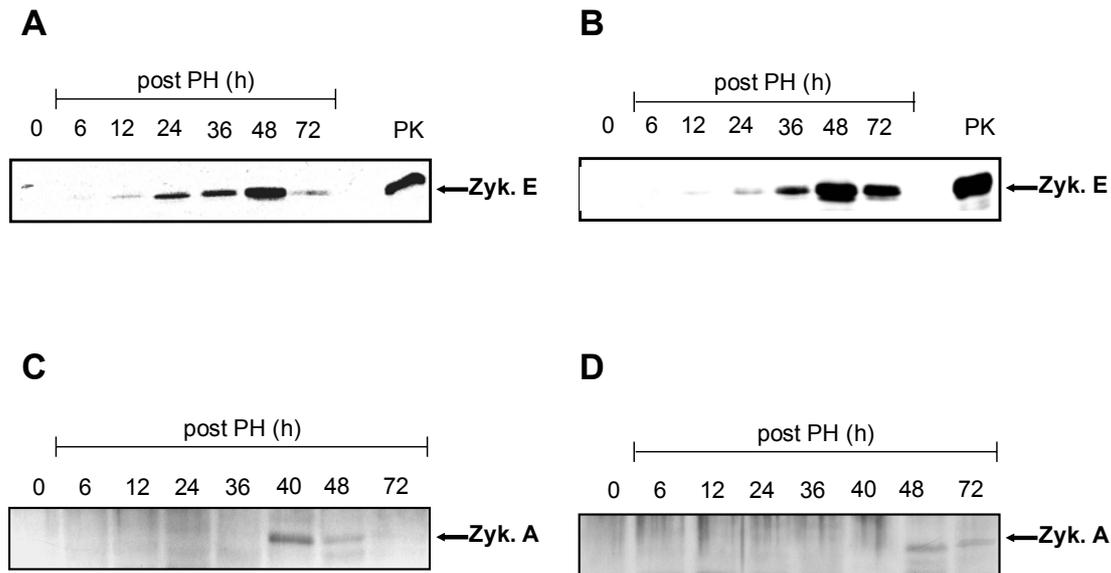


Abb. 20: Das Expressionsmuster von Zyklin A und E in den gp130loxP MxCre positiven Mäusen zeigt Unterschiede zur Expression in den MxCre negativen Tieren nach partieller Hepatektomie. Die Zyklin E (A, B) und A (C, D) Expression wurde in gp130 loxP MxCre negativen (A, C) und positiven (B, D) Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Hepatektomie mittels Western-Blot bestimmt. Pfeile markieren die Position von Zyklin E und A.

### 3.2.6 Analyse der Genexpression in den Kontroll- und Knock out Tieren nach Stimulation mit IL-6 durch einen Gen Array

Früher durchgeführte Experimente in IL-6 Knock out Tieren zeigten wesentlich dramatischere Unterschiede in der Zellzyklusabfolge im Vergleich zu Kontrolltieren (Sakamoto et al. 1999, Cressmann et al 1996). Um die Auswirkung des gp130 Rezeptors und von IL-6 auf spezifische Signalwege weiter aufzuschlüsseln, wurden sowohl gp130 Knock out Tiere als auch Kontrollen mit IL-6 stimuliert. Anschließend wurde die Leber in einer Gruppe 3 Stunden, und in einer zweiten Gruppe 6 Stunden nach Injektion aus den Tieren entnommen. Aus den Lebern der Tiere wurde mRNA isoliert und für die Gen Array Analyse aufgereinigt. Es wurden sowohl unstimulierte mit stimulierten Mäusen beider Gruppen verglichen, als auch beide Gruppen untereinander. Der Schwerpunkt bei diesem Vergleich wurde auf Zell Zyklus Gene und auf Zellzyklus assoziierte Gene gelegt.

Bei dem Vergleich konnte kein wesentlicher Unterschied in der Expression von Zyklinen, Zyklin abhängigen Kinasen und Zell Zyklus Inhibitoren festgestellt werden. Allerdings konnte eine IL-6 abhängige Expression der Immediate early Gene c-Jun und c-myc, die vermutlich einen Einfluß auf den G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Übergang haben, gefunden werden (Abb. 21). Die Unterschiede in der c-Jun Expression unterstützen die erhobenen AP-1 Daten während der Regeneration (s. Abb. 17), da der Array keine Induktion von c-Jun in den gp130 deletierten Tieren nach IL-6 Stimulation zeigt und bei den Regenerationsexperimenten eine stark verspätete Aktivierung von AP-1 zu sehen ist.

Die c-myc Expression wurde zusätzlich durch eine Northern Analyse auch nach Hepatektomie in beiden Gruppen untersucht. Sowohl die in den Kontrolltieren gefundene basale Expression von c-myc als auch die nach PH erfolgende Induktion ist in den induzierten Knock out Mäusen deutlich reduziert (Abb. 21).

Im DNA-Array wurde eine Reihe von unterschiedlich regulierten Genen im Vergleich der beiden Gruppen gefunden, die aber alle keinen direkten Einfluß auf den Zellzyklus haben (Abb. 22). Interessanterweise waren einige Gene, in den Knock out Tieren nach IL-6 Injektion reguliert. Dies dürfte entweder auf einen Artefakt oder auf sekundäre Mechanismen zurückzuführen sein, da in allen verwendeten Tiere durch Southern-Blot ein vollständiger Knock out von gp130 nachgewiesen wurde.

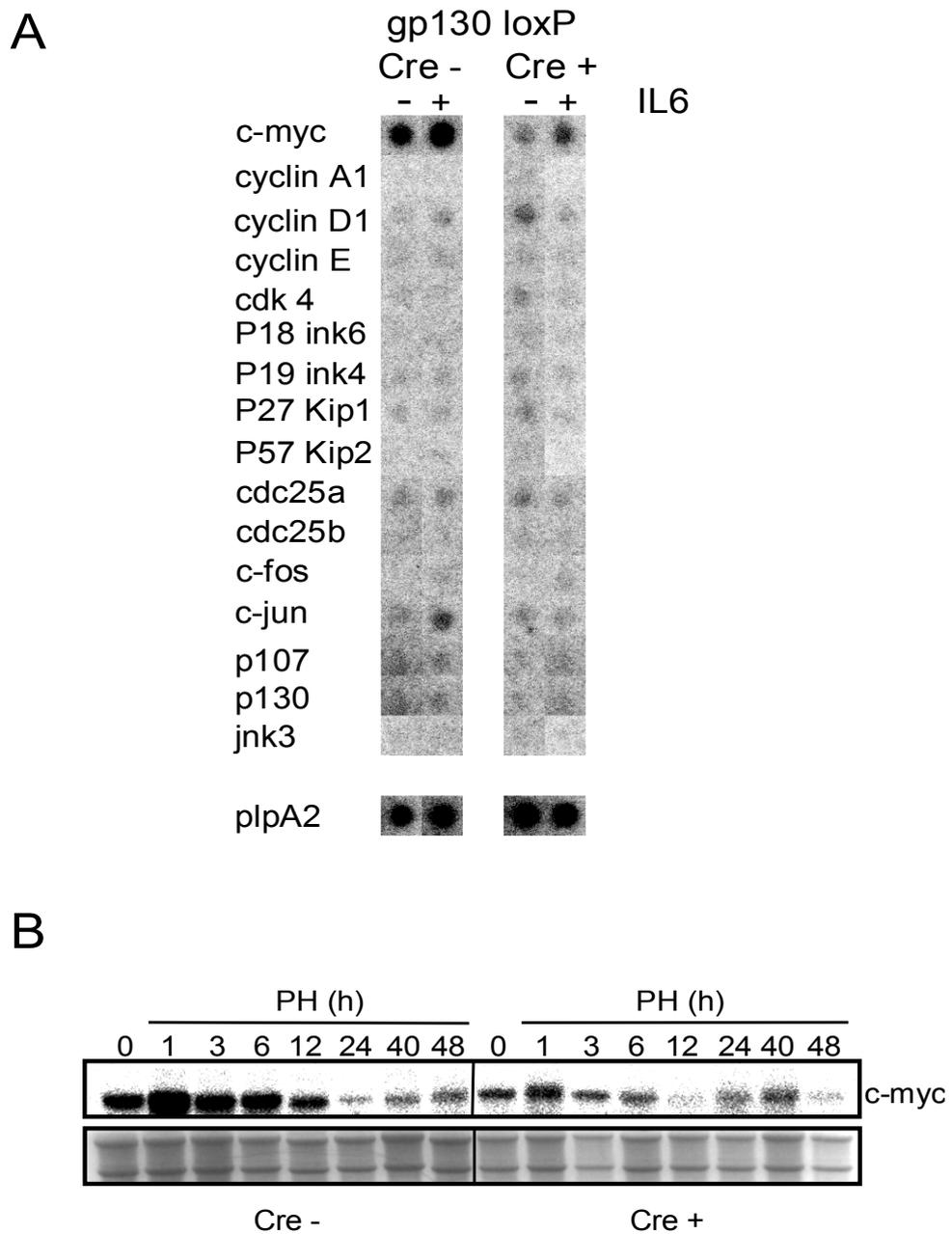


Abb. 21: Bedeutung von IL-6 abhängigen Signalwegen auf Zellzyklus relevante Gene. (A) Sowohl gp130 loxP (+/+)/ MxCre positive als auch negative Tiere wurden mit IL-6 stimuliert. Es wurde mit den verschiedenen Gruppen CDNA-Arrays durchgeführt. Der Einfluß auf Zellzyklus relevante Gene wird gezeigt. (B) Es wurden Northern-Blot-Analysen mit Zeitpunkten vor und nach partieller Hepatektomie von gp130 loxP MxCre negativen und positiven Mäusen durchgeführt. Die Membranen wurden mit radioaktiv markierten c-myc Sonden behandelt. Die Position des c-myc Signals ist gekennzeichnet (oberer Teil der Abbildung). Als Kontrolle ist das Ethidiumbromid gefärbte RNA Gel gezeigt (unterer Teil der Abbildung).

Array#	Gen	0 -/+	0/6 +	0/6 -	6-/6+
109	NAB 2	+ 3,8	+ 1,7	-	-
240	FREAC 1	+ 5,2	-	-	-
307	TFDP 1	+ 3,1	-	-	+ 1,9
308	E2F5	+ 3,5	-	-	+ 2,6
315	STAT5a	+ 12,7	- 2,2	+ 40,4	-
322	Cyc. T1	-	- 2,3	-	-
325	CCNA 1	-	- 1,6	-	-
334	Cyc. D2	+ 2,1	-	-	-
339	cdk 7	-	- 2,8	-	-
447	junB	- 2,1	+ 2,6	-	-
455	c-myc	- 3,9	+ 2,4	+ 1,5	- 2,6
548	GABT 1	+ 156	-	+ 283,2	- 1,6
591	TNFR2	-	- 1,7	+ 3,3	- 4,5
627	IL-1 R	+ 3,6	-	+ 5,6	- 2,4
661	IL6 R a	-	- 1,5	- 2,0	-
652	GMCSF R	+ 3,3	-	-	+ 2,65
694	GH	+ 3,3	- 2,4	-	+ 1,8
722	Serotonin R	+ 17,5	+ 2,0	-	+ 42,3
851	TAK 1	-	- 1,7	-	-
862	Dvl 1	-	- 1,5	- 2,3	-
870	SOCS-2	-	- 1,7	+ 1,7	- 1,7
881	Hek 2	+ 14,6	- 2,8	+ 4,3	-
893	gp130	-	- 1,5	- 1,9	-
944	IKKgamma	-	- 1,7	-	-
950	Mek 1	+ 2,6	- 4,2	-	-
960	PP2-c-alpha	-	- 4,0	- 5,0	-
1008	Dvl 2	+ 3,7	- 7,0	+ 2,3	- 4,3
1042	SP12.4	+ 2,2	-	+ 4,8	- 2,4
1092	Fibronectin	-	- 2,0	-	-
1131	RAD 23 B	-	- 4,5	-	- 3,7
1132	RAD 23 A	-	- 4,6	-	-
1179	PTEN	-	- 3,0	-	- 2,4

Abb. 22: Auswertung des durchgeführten cDNA-Arrays. Es wurden alle Gruppen miteinander verglichen. Die Nummern stehen für die im Array bezeichnete Position. In der obersten Reihe ist angegeben, welche Gruppen miteinander verglichen wurden. 0-/+ bezeichnet den Vergleich von der Gruppe nicht IL-6 induzierter Mx-Cre (-) mit Mx-Cre (+) Mäusen. Das Vorzeichen in der Tabelle bezeichnet entweder eine Erhöhung (+) oder eine Verringerung (-) in der Expression des entsprechenden Gens (die Array-Daten wurden in Zusammenarbeit mit Christian Klein erhoben).

### 3.2.7 Die Aktivierung der Akut Phase ist in gp130(+/+)/Mx-Cre Mäusen blockiert

IL-6 ist an der Induktion der Akut-Phase-Genexpression beteiligt (Kim und Baumann, 1999). Die Akut Phase stellt eine erste Barriere in der Verteidigung gegen bakterielle Infektionen dar (Trautwein et al 1994). Die Synthese der Akut-Phase-Proteine erfolgt vornehmlich in den Hepatozyten. Die Aktivierung dieses Abwehrmechanismus ist

sehr schnell, so daß ein Zeitgewinn bis zur Aktivierung der spezifischen Abwehr entsteht. Da nach abdominal chirurgischen Eingriffen die Gesundheit eventuell auf der Fähigkeit der Leber beruht die Akut-Phase-Proteine zu induzieren, um eine unspezifische Abwehrreaktion zu gewährleisten, wurde die Expression der Akut-Phase-Gene Serum Amyloid A (SAA), Haptoglobin, Hemopexin und des negativ regulierten Gens für Albumin in den gp130 Knock out Tieren nach PH mit einer Northern Analyse untersucht. Die Detektion und Quantifizierung erfolgte über den Phosphorimager.

In den Kontrolltieren konnte vor der Operation eine sehr schwache Expression von SAA festgestellt werden. Die Expressionsstärke erhöhte sich schon 3 Stunden nach PH und erreichte das Maximum bei 12 bis 24 Stunden nach PH. Im Gegensatz dazu konnte in den induzierten Knock out Tieren eine wesentlich schwächere Expression vor der partiellen Hepatektomie festgestellt werden, zu späteren Zeitpunkten war keine Expression mehr nachzuweisen. Auf Grund der kaum nachweisbaren Detektion von SAA mRNA im Phosphorimager konnte hier keine quantitative Analyse vorgenommen werden. Die Expression von Haptoglobin und Hemopexin verhielt sich in den Kontrolltieren vergleichbar. Eine Steigerung der Expression konnte 3 Stunden nach Operation nachgewiesen werden mit einer maximalen Expressionsstärke 12 Stunden bis 24 Stunden nach PH, die bei Hemopexin laut Phosphorimageranalyse bis zu 8fach und bei Haptoglobin bis zu 4fach über der Expression des Nullzeitpunkt lag. Die gp130 deletierten Mäuse zeigten über den gesamten betrachteten Zeitraum keine Veränderung in der Expressionsstärke dieser beiden Akut-Phase-Gene. Albumin ist ein negativ reguliertes Akut-Phase-Gen. In den Kontrolltieren verringert sich die Expression von Albumin 3 Stunden nach PH und erreicht eine um 80% verringerte Expressionsstärke 24 Stunden nach der Operation. Danach steigt das Signal für die Albumin-mRNA wieder an. Die gp130(+)/Mx-Cre(+) Mäuse zeigen kaum eine Verringerung der Expression gegenüber dem Zeitpunkt vor der Hepatektomie (Abb. 23 und 24)

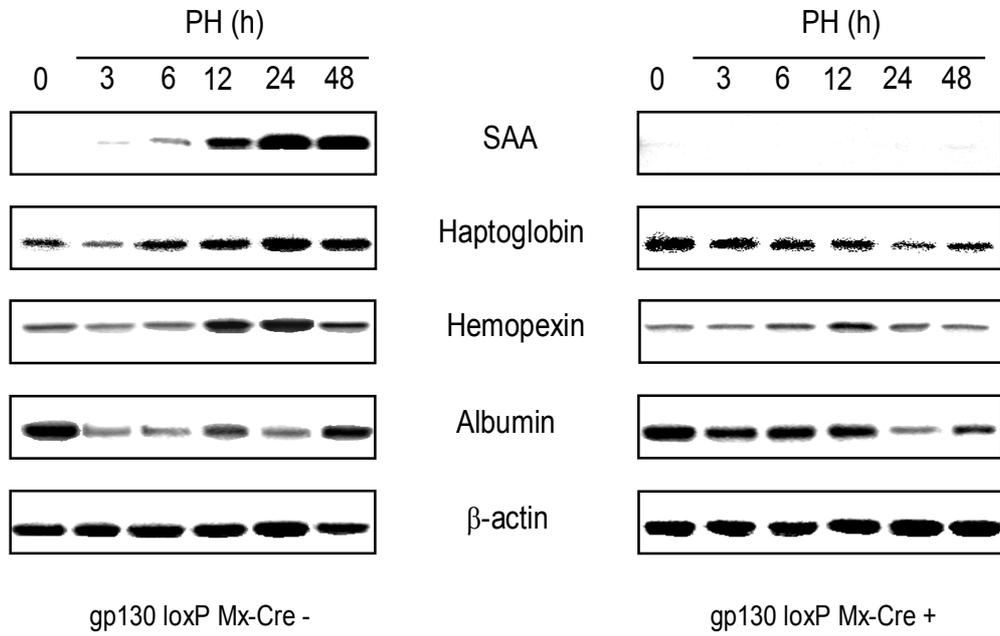


Abb. 23: Die *gp130* deletierten Mäuse zeigen eine blockierte Akut Phase Reaktion nach partieller Hepatektomie. Es wurde die mRNA Expression von verschiedenen Akut Phase Genen mit radioaktiven cDNA Proben untersucht. Als RNA-Ladekontrolle diente eine Hybridisierung mit  $\beta$ -Aktin.

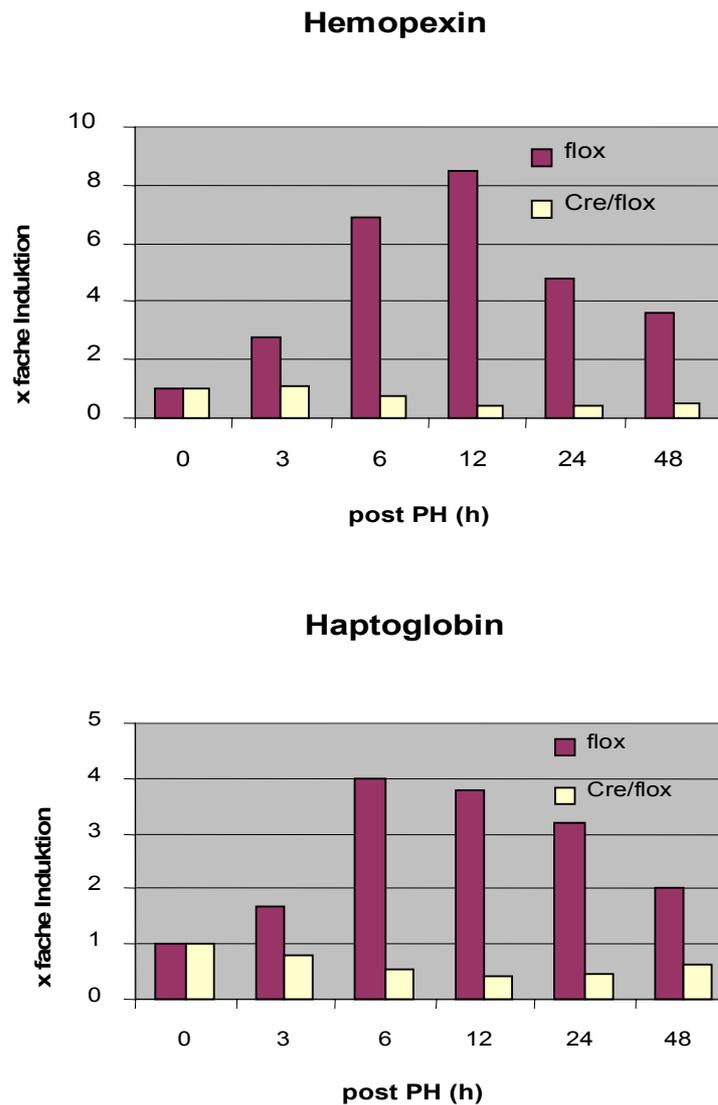


Abb. 24: Quantitative Auswertung der mRNA Expression für Haptoglobin und Hemopexin nach Phosphorimager Analyse.

### 3.2.8 Sowohl gp130 als auch IL-6 Knock out Tiere sind nach partieller Hepatektomie gegenüber LPS hypersensitiv

Da die Aktivierung der Akut-Phase-Gene in den Knock out Tieren inhibiert ist, und gp130 scheinbar keinen Einfluß auf die Leberregeneration über eine direkte Regulierung des Zellzyklus besitzt, stellte sich die Frage, ob die gp130 abhängigen Signalwege über einen anderen Mechanismus auf die Regeneration einwirken.

Deshalb wurde untersucht, wie sich während des Regenerationsvorgangs ein zusätzlicher negativer Stressfaktor, wie z.B. eine bakterielle Infektion auswirkt.

Um eine bakterielle Infektion zu simulieren, wurde den verschiedenen Tiergruppen 3 Stunden nach Durchführung der partiellen Hepatektomie 30 µg LPS pro 20 g Mausgewicht intraperitoneal injiziert. Danach wurde bis zu 48 Stunden nach der Operation die Überlebensrate der verschiedenen Gruppen bestimmt. Die gp130(+)/Mx-Cre(+) Mäuse zeigten gegenüber den Kontrolltieren eine deutlich schlechtere Überlebensrate. Nach 48 Stunden lebten nur noch 40% der Tiere aus der gp130 deletierten Gruppe. Von den Kontrolltieren überlebten hingegen 85% (Abb. 25).

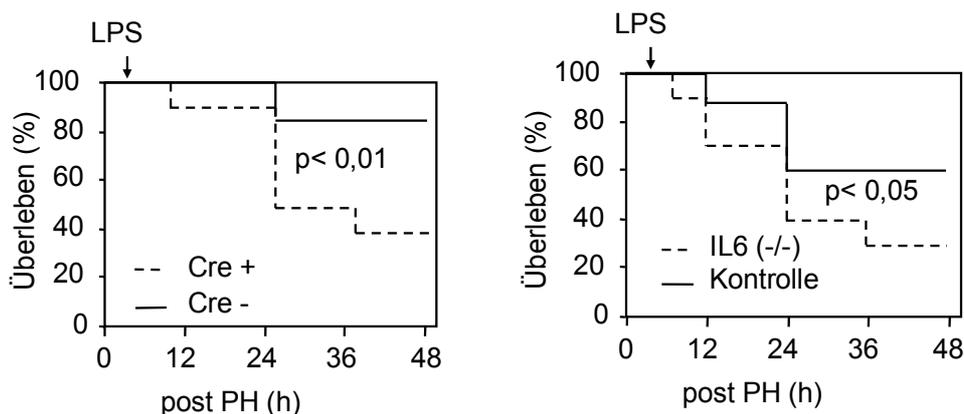


Abb. 25: Überlebenskurve von gp130 loxP (+/+) MxCre positiven und negativen und IL-6<sup>-/-</sup> und NMRI Kontrollen nach partieller Hepatektomie und Stimulation mit 30 µg LPS.

Die Überlebensraten korrelierten mit einer verringerten DNA-Synthese in den überlebenden Knock out Tieren. Durch einen BrdU-Assay konnte eine um 20 bis 30% geringere Anzahl von BrdU positiven Leberzellen im Vergleich zu den Kontrollen gezeigt werden (Abb. 26).

Da LPS einen so starken Effekt auf die Überlebensrate als auch die DNA Synthese in gp130 deletierten Mäusen besaß, wurde dieser Effekt auch in IL-6 Knock out Tieren untersucht. Die IL-6  $-/-$  Mäuse als auch die Kontrollen (NMRI Mäuse) wurden ebenfalls 3 Stunden nach Hepatektomie mit 30  $\mu$ g LPS pro 20 g Maus behandelt. Innerhalb von 48 Stunden nach der Operation starben etwa 70% der IL-6  $-/-$  Tiere. Von den Kontrolltieren starben hingegen nur 40% der Mäuse. Die IL-6  $-/-$  Mäuse scheinen während der Regenerationsphase gegenüber LPS anfälliger zu sein (Abb. 26), wie die gp130 Knock out Tiere. Die Überlebenskurven spiegelten sich auch in der DNA-Syntheserate in den überlebenden Tieren 48h nach der Operation wieder. Die IL-6 Knock out Mäuse zeigten eine deutlich geringere BrdU Einbaurrate gegenüber den NMRI-Tieren (Abb. 26).

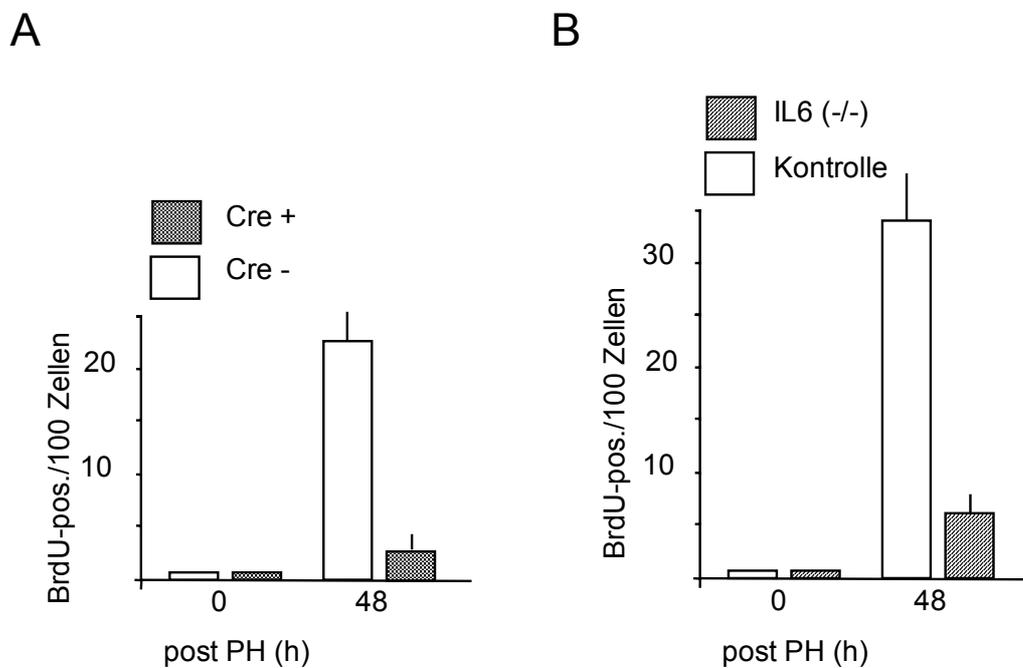


Abb. 26: Quantitative Auswertung der BrdU Färbung von Leberschnitten zum Zeitpunkt 48h nach partieller Hepatektomie sowie vor Hepatektomie. Verglichen werden gp130 loxP(+/+) MxCre positive mit negativen und IL-6 $-/-$  mit NMRI Kontrollmäusen.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden IL-6 abhängige Signalwege im Rahmen der Leberregeneration näher untersucht.

Interleukin-6 wurde 1986 kloniert (Hirano et al., 1986; Zilberstein et al., 1986; May und Sehgal, 1986; Haegeman et al., 1986) und war ursprünglich unter den Namen Interferon- $\beta_2$  (IFN- $\beta_2$ ) (Zilberstein et al., 1986; May et al., 1986), IL-1-inducible 26 kD protein (Haegeman et al., 1986) und als B-cell-stimulating factor (Teranishi et al., 1982; Hirano et al., 1986) beschrieben. IL-6 gehört neben LIF, OSM, CNTF, IL-11, CT-1 der Interleukin-6-Zytokinfamilie an (Bazan et al., 1990; Bazan et al., 1992). IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, das in die Regulation der Immunantwort, der Hämatopoese und der Akut-Phase-Antwort involviert ist (Sehgal et al., 1989; Van Snick et al., 1990; Hirano et al., 1992). Im Detail gibt es unter anderem Veröffentlichungen zu folgenden IL-6 Wirkungen:

- Beteiligung von IL-6 an der Sekretion von Immunglobulinen aus B-Zellen
- Beteiligung an der Reifung von Megakaryozyten
- Beteiligung an der Koloniebildung hämatopoetischer Stammzellen
- Beteiligung am Wachstum und an der Differenzierung von T-Zellen
- Beteiligung an der Regulation der Leberregeneration
- Beteiligung an der Akut-Phase-Antwort

(Trautwein et al., 1994; Fischer et al., 1997; Heinrich et al., 1990; Cressman et al., 1995; Akira und Kishimoto, 1992; Baumann und Gauldie 1990).

Die Wirkung von IL-6 wird über zwei Rezeptorkomponenten vermittelt. Dabei bindet IL-6 an den IL-6-Rezeptor, der aus einer IL-6-spezifischen Rezeptoruntereinheit gp80 ( $\alpha$ -Kette) und aus einer Signaltransduktionsuntereinheit gp130 ( $\beta$ -Kette) besteht. Beide Untereinheiten des IL-6-Rezeptors gehören zur Typ-I-Zytokin-Rezeptor-Superfamilie (Yamasaki et al., 1988; Bazan et al., 1989; Hibi et al., 1990; Hirano et al., 1994). Die aktuelle Theorie geht davon aus, daß es durch die Bindung der Komponenten zu einer Dimerisierung von zwei gp130 Untereinheiten kommt. Nach Dimerisierung findet eine Phosphorylierung von Tyrosinen im zytoplasmatischen

Bereich von gp130 statt. Durch diese Aktivierung können nachfolgend der Stat3, Stat1 und der Raf/Ras Signalweg angeschaltet werden.

#### **4.1 Die Hyperstimulation mit IL-6 inhibiert die Zellzyklusprogression nach partieller Hepatektomie in hsgp80 transgenen Mäusen**

Initiale Beobachtungen zeigten, daß Stat3 im Rahmen der Leberregeneration aktiviert wird (Cressman et al., 1995; Trautwein et al., 1996). Darauf aufbauend erfolgten weiterführende Untersuchungen an IL-6<sup>-/-</sup> Knock out Mäusen durch Cressman und Mitarbeiter (1996). Diese Experimente belegten, daß die fehlende Aktivierung von Stat3 mit einer verminderten Proliferation der Hepatozyten nach partieller Hepatektomie korrelierte. Die verminderte Proliferation der Hepatozyten in der IL-6<sup>-/-</sup> Maus ist durch die Gabe von IL-6 kompensierbar. Die Versuche deuten daraufhin, daß IL-6 für die Leberregeneration von zentraler Bedeutung ist, und dabei die Aktivierung von Stat3 allein über den gp130-Rezeptor erfolgt (Cressman et al., 1996).

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse konzentrierten sich die Überlegungen zur Leberregeneration in Verbindung mit IL-6 auf die Aktivierung von Stat3. Es muß aber bedacht werden, daß durch die intrazelluläre Domäne des gp130 Moleküls verschiedene Signalkaskaden aktiviert werden können. Von potentiellm Interesse für die Leberregeneration ist neben der Aktivierung der Stat/Jak-Signalkaskade, der Ras/Map-Signalweg. In Zellkultursystemen wurde die Bedeutung dieser beiden Signalkaskaden des gp130 Moleküls untersucht (Fukada et al., 1996; Ihara et al., 1997). In B-Zellen führt die Aktivierung von Stat3 zur Induktion von anti-apoptotischen Genen wie z.B. bcl-2. Die Aktivierung der Ras/Map-Kinase-Kaskade hingegen hat einen entscheidenden Einfluß auf die Proliferation der Zellen (Fukada et al., 1996). In Zellen neuronalen Ursprungs (PC12-Zellen) konnte für die beiden Signalwege des gp130 Rezeptors gezeigt werden, daß der Ras/Map-Kinase-Weg die Differenzierung der Zellen induziert, hingegen die Aktivierung von Stat3 die Differenzierung der Zellen blockiert (Ihara et al., 1997). Somit gehen vom gp130 Rezeptor in diesen beiden unterschiedlichen Zellsystemen zwei gegensätzliche Signalwege aus.

Die besondere Rolle von IL-6 für die Regeneration der Leber konnte auch an TNF-Rezeptor 1 Knock out Mäusen gezeigt werden. Nach partieller Hepatektomie ist die Regeneration in den TNFR 1 -/- Tieren gestört. Es kommt nach 24 Stunden zu einer verminderten Aktivierung von NFkB und der DNA Synthese. Vergleichbar zu den Ergebnissen in den IL-6 Knock out Mäusen (Cressman et al., 1996) kann die Zellzyklusprogression der Hepatozyten auch in den TNFR 1 -/- Mäusen durch die Gabe von IL-6 wiederhergestellt werden (Yamada et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Zellzyklusprogression von Hepatozyten inhibiert bzw. verzögert wird, wenn hsgp80 transgene Mäuse mit hIL-6 stimuliert werden. Dies resultiert in einer entsprechenden Verlangsamung/Inhibition der Leberregeneration. Frühere Untersuchungen konnten eine Abfolge von Zytokinen – TNF und IL-6 – feststellen, deren Serumkonzentrationen sich nach partieller Hepatektomie erhöhen. Zu einem späteren Zeitpunkt beginnen die Hepatozyten zu proliferieren (Trautwein et al., 1996). Diese Ergebnisse konnten durch den Einsatz von TNFR1 und IL-6 Knock out Mäusen näher definiert werden (Cressman et al., 1996; Yamada et al., 1997). In beiden Mausstämmen wurde ein Defekt in der Hepatozytenproliferation beschrieben. Zudem sterben einige Mäuse während der Regenerationsphase nach partieller Hepatektomie. Durch die Stimulation mit rekombinantem IL-6 konnte in beiden Fällen der "Proliferationsphänotyp" aufgehoben werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine sukzessive Wirkung von zuerst TNF- $\alpha$  und dann IL-6 hin, was zu einem Übergang von ruhenden Hepatozyten zu proliferierenden Hepatozyten führt.

Interessanterweise führte in beiden Studien die Stimulation mit IL-6 im Vergleich zu den Kontrolltieren zu einer stärkeren Induktion von Stat3, die mit einer Reduktion der S-Phase-Progression einhergeht. Dieses Ergebnis ist ein erster Hinweis, daß IL-6 möglicherweise einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die DNA-Synthese während der Leberregeneration hat.

Deshalb wurde in dieser Arbeit die weitere Auswirkung einer IL-6-Überstimulation auf das Regenerationsvermögen der Leber und die Hepatozytenproliferation untersucht. Die Aufklärung der molekularen Auswirkungen einer vermehrten IL-6 Stimulation

könnte interessant sein, da in einigen klinischen Manifestationen wie zum Beispiel der chronischen Hepatitis erhöhte IL-6 Serumwerte festgestellt wurden. Bislang wird noch diskutiert, ob diese Erhöhung eher die Regeneration der Leber oder aber die Entstehung einer Fibrose unterstützt (Kakumu et al., 1992; Malaguarnera et al., 1997; Napoli et al., 1994).

Um die Rolle von IL-6 während der Leberregeneration zu analysieren, wurden für die ersten Untersuchungen transgene Tiere gewählt, die den humanen löslichen gp80 Rezeptor leberspezifisch überexprimieren. Da das humane gp80 Molekül nur humanes IL-6 bindet, das murine gp80 aber in der Lage ist sowohl mit humanem IL-6 als auch mit endogenem IL-6 zu interagieren, kann man in diesen Tieren gezielt eine IL-6-Überstimulation durchführen. Nach Stimulation mit hIL-6 wurde bereits eine länger und stärker andauernde Aktivierung von Akut Phase Genen beschrieben (Peters et al., 1996). Allerdings wurden bislang keine Untersuchungen bezüglich der Aktivierung der intrazellulären gp130 abhängigen Signalwege durchgeführt. Deshalb wurde als erstes die Aktivierung von Stat3 und des Ras/MAP Kinasewegs in den Lebern von hsgp80 transgenen Mäusen nach hIL-6 Stimulation ohne partielle Hepatektomie untersucht.

Diese Experimente zeigten, daß eine IL-6 Injektion in die hsgp80 Tiere zu einer lang anhaltenden Aktivierung von Stat3 führt. Dies wurde über die spezifische Affinität des Transkriptionsfaktors an eine DNA-Konsensus-Bindungssequenz durch EMSA-Analysen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigte das Experiment in Bezug auf die Aktivierung des Ras/MAP Kinasewegs keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Kontrolltieren, was durch die Untersuchung der ERK Phosphorylierung nachgewiesen wurde. Die Mechanismen, die zur verlängerten Stat3 Aktivierung in den transgenen Tieren führen, ist bislang nicht verstanden. Nach Applikation von hIL-6, sinkt dessen Serumkonzentration deutlich schneller ab, als die Stat3 Aktivierung nachlässt. Es muß also Mechanismen geben, die die Stat3 Aktivierung aufrechterhalten, obwohl kein Serum-hIL-6 mehr nachweisbar ist. Für dieses Phänomen sind mindestens zwei Erklärungen denkbar: 1. Das an hsgp80 gebundene hIL-6 kann nicht mit dem eingesetzten ELISA nachgewiesen werden und der Komplex aus beiden Molekülen hat eine längere Serumhalbwertszeit als hIL-6 alleine. 2. Auf Rezeptorebene könnte eine längere Bindungs- und

Internalisierungskinetik vorliegen, wenn hsgp80/hIL-6 an den das Signal weiterleitenden Rezeptor gp130 binden.

Da die Stimulation mit hIL-6 in den hsgp80 Tieren zu einer verlängerten Stat3 Aktivierung führte, wurde dieser Ansatz genutzt, um den Einfluß auf die Zellzyklusprogression nach 2/3 Hepatektomie zu untersuchen. Auch die vor partieller Hepatektomie stimulierten hsgp80 Mäuse zeigten im Vergleich zu den ebenfalls stimulierten Kontrolltieren eine verlängerte Stat3 Aktivierung. Die starke Stat3 Aktivierung führte in den hsgp80 Tieren zu einer Verzögerung der S-Phase und einer Reduktion der Anzahl proliferierender Hepatozyten, was durch die BrdU Analyse gezeigt werden konnte. Der Start der S-Phase war um mehr als 8 Stunden verzögert und das Maximum BrdU positiver Zellen lag um etwa 40% unter der der Kontrollgruppe. Die weiteren Untersuchungen zeigten eine Korrelation der BrdU Daten mit der Aktivierung des G1-Phasen-Zyklins E und des S-Phasen-Zyklins A.

Um auszuschließen, daß in den hIL-6 behandelten Mäusen die hsgp80 Konzentrationen, der limitierende Faktor für die Aktivierung der gp130 abhängigen Signalwege ist, wurden die Serumspiegel gemessen. Dieser Versuch zeigte, daß über den gesamten beobachteten Zeitraum die hsgp80 Proteinmenge im Serum beider Versuchsgruppen erhöht war. Demnach variiert die hsgp80 Konzentration nach partieller Hepatektomie nur schwach und verhält sich in beiden Versuchsgruppen annähernd gleich. Auf Grund dieser Beobachtung kann man schließen, daß die Serumkonzentration des löslichen Rezeptors nicht für die beobachteten Effekte nach partieller Hepatektomie in den transgenen Tieren verantwortlich sein kann.

Um die Auswirkungen der Hyperstimulation auf den Zellzyklus besser zu verstehen, wurde als nächstes die Expression der Zellzyklusinhibitoren (protein kinase inhibitors, PKIs) p21 und p27 in den Tieren untersucht. Es ist bekannt, daß Stat3 die Expression von p21 auf transkriptioneller Ebene reguliert. Zusätzlich kontrolliert IL-6 die Expression von C/EBP $\beta$ /NF-IL-6 (Akira et al., 1990; Poli et al., 1990). Eine erhöhte Expression von C/EBP $\beta$ /NF-IL-6 blockiert die Hepatozytenproliferation (Buck et al., 1994; Barone et al., 1994) und induziert die p21 Expression (Chinery et al., 1997), was die Zellzyklusinhibition nach Hepatektomie unterstützt. In Einklang mit

diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß IL-6 in Hepatomzelllinien die p21 Promotoraktivität um das 3 bis 5fache induzieren kann (Daten nicht gezeigt). Allerdings stieg in vivo die p21 Expression in der hIL-6 behandelten Gruppe sofort nach Hepatektomie an. Dies deutet daraufhin, daß zusätzliche post-transkriptionellen Mechanismen für die Erhöhung der p21 Expression nach hIL-6 Injektion in den hsgp80 Tieren verantwortlich sind. In mehreren früheren Untersuchungen wurde die p21 Expression nach Hepatektomie analysiert (Ehrenfried et al., 1997; Jaumot et al., 1999; Trautwein et al., 1999; Ledda-Columbano et al., 2000). Für diese Untersuchungen setzten die verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Tierarten und Stämme ein. Diese Unterschiede in den Versuchsbedingungen könnten erklären, warum in der Literatur kein einheitliches Expressionsprofil für p21 nach Hepatektomie zu finden ist. Beschrieben ist hauptsächlich eine IL-6/gp130 abhängige Regulation des Zellzyklusinhibitors (Florenes et al., 1999; Chin et al., 1996). Dabei wird die Expression auf transkriptioneller-Ebene über die Stat-Signalkaskade kontrolliert. Es ist deshalb gut vorstellbar, daß es einen konzentrationsabhängigen Effekt von IL-6 gibt, so daß es bei einer Überstimulation mit IL-6 zu einer Hemmung der Regeneration kommt. Diese Interpretation wird durch die lang anhaltende Stat3 Aktivierung unterstützt, die man in den stimulierten hsgp80 transgenen Tieren sehen kann. Es gibt aber auch gegensätzliche Veröffentlichungen, in denen von einer p21 Induktion beim Ausbleiben des Stat3 Signals berichtet wird (Fukada et al., 1998).

Neben dem Anstieg von p21 konnte ein Anstieg der p27 mRNA, dem zweiten untersuchten Zellzyklusinhibitor, nachgewiesen werden. Allerdings sind die für p27 präsentierten Daten schwierig zu interpretieren, da es nicht gelang das Protein nachzuweisen. Eine Korrelation von einer höheren p27 Expression mit dem Zellzyklusarrest nach IL-6 Stimulation wurde für Melanomzellen beschrieben (Kortylewski et al., 1999).

Im Gegensatz zu den Resultaten aus Untersuchungen in Melanomzellen und hepatischen Zellen (Florenes et al., 1999; Kortylewski et al., 1999; H. Kim und H. Baumann, 1999), zeigten IL-6-Stimulationsexperimente in hematopoetischen und neuronalen Zellen eine proliferationsfördernde Wirkung. In den neuronalen Zellen ist der intrazelluläre gp130 Signalweg von Bedeutung, um die Zellteilung oder

antiapoptotische Mechanismen zu induzieren (Ihara et al., 1997; Fukada et al., 1998). Für Stat3 gibt es zusätzlich Hinweise, daß es potentiell onkogen in transformierten Fibroblasten wirkt (Bromberg et al., 1999). Für hepatische Zelllinien gibt es nur wenige Berichte, die den Einfluß der unterschiedlichen gp130 abhängigen Signalwege auf den Zellzyklus untersuchen. Eine relativ neue Untersuchung zeigt allerdings, daß eine IL-6 Stimulation in Hepatomzellen die Proliferation inhibiert (H. Kim und H. Baumann, 1999). Bei genauerer Aufschlüsselung der Signalwege, konnten die Untersucher zeigen, daß dieser Effekt weniger ausgeprägt ist, wenn die für die Stat3 Aktivierung wichtige Domäne im cytoplasmatischen Schwanz des gp130 Rezeptors entfernt wurde. Demzufolge kann IL-6 in Hepatomzelllinien wie auch in einigen anderen Zelllinien über die Aktivierung von Stat3 wachstumshemmend wirken (Kortylewski et al., 1999; H. Kim und H. Baumann, 1999; Bellido et al., 1998). In Makrophagen konnte gezeigt werden, daß der für die Stat-Aktivierung wichtige Teil des zytoplasmatischen Anhangs des gp130 Rezeptors wichtig für die Differenzierung und den Proliferationsarrest ist (Yamanaka et al., 1996). Es scheinen also teilweise gegensätzliche Signale Zelltyp-spezifisch vom jeweiligen gp130-spezifischen Signalweg auszugehen.

In den hier vorgenommenen in vivo Versuchen führte die hIL-6 Stimulation in den hsgp80 transgenen Mäusen zu einer lang anhaltenden Induktion von transkriptionel aktivem Stat3. Der Effekt auf die Aktivierung des MAP-Kinasewegs war weniger ausgeprägt. Es gibt Hinweise, daß der MAP Kinase Signalweg entscheidend für die Regulation der G1 Phasenprogression in proliferierenden Hepatozyten ist (Talarmin et al., 1999). Diese Befunde sprechen dafür, daß die Ergebnisse, die von Kim und Baumann in Hepatomzellen erhoben wurden, auf die in vivo Situation übertragbar sind. Physiologische Dosen von IL-6 während der Regeneration der Leber scheinen in diesem Fall wichtig für den G0/G1-Phasenübergang zu sein (Cressman et al., 1996). Allerdings scheint eine Hyperstimulation von IL-6 zu einer Verzögerung und Inhibierung der Proliferation des Hepatozyten zu führen. Interessanterweise wurden schon 1994 Interleukin 6 transgene Mäuse generiert, die IL-6 im starken Maße in der Leber überexprimieren (Fattori et al., 1994). Diese Tiere zeigten eine permanente Aktivierung der Akut-Phase-Proteine und deutliche Schäden in der Niere und IgG Plasmazytosen. Allerdings entwickelten diese Mäuse über ihr ganzes Leben keine morphologischen oder enzymatischen Veränderungen in der Leber.

Unklar bleibt, warum IL-6 einen unterschiedlichen Effekt auf Zellen von hepatischem und hematopoetischem Ursprung hat. Es gibt Hinweise, daß IL-6 während der Embryonalentwicklung die Proliferation und Differenzierung von hematopoetischen Zellen reguliert. Der auffälligste Phänotyp von doppeltransgenen IL-6/hsgp80 Mäusen ist die Repopulation der Leber mit hematopoetischen Zellen, analog zur Situation während der Embryonalentwicklung (Peters et al., 1997). Im Gegensatz dazu wurde für hepatische Zellen gezeigt, daß ein anderes Zytokinfamilienmitglied – Oncostatin, und nicht IL-6 – zu diesem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung von Bedeutung ist (Kinoshita et al., 1999; Kamiya et al., 1999). Deshalb scheint es wahrscheinlich, daß zwei Mitglieder derselben Zytokinfamilie unterschiedliche Funktionen auf die Regulation des Wachstums hematopoetischer- oder hepatischer-Zellen ausübt.

#### **4.2 IL-6/gp130 abhängige Signalwege wirken protektiv während der Leberregeneration**

Konventionell generierte gp130 defizienten Mäuse sind nicht lebensfähig, wobei die Ursache hierfür bislang nicht geklärt ist. In einem 129/C57BL/6 Hintergrund starben homozygot mutante Tiere sukzessive ab Tag 12.5 der Embryonalentwicklung (Yoshida et al., 1996). Dagegen sterben die in dieser Arbeit verwendeten konditionalen Knock out Mäuse mit einem gemischten genetischen Hintergrund (129, C57BL/6, CBA, Balb/c) sowie Tiere auf einem ICR Hintergrund postnatal (Betz et al., 1998; Kawasaki et al., 1997). Homozygot gp130 deletierte Tiere waren deutlich kleiner als ihre heterozygoten oder Wildtyp Geschwister. Auch Jak1-defiziente Mäuse, welche ebenfalls Defekte in der gp130 Signalkaskade aufweisen, sterben perinatal (Rodig et al., 1998). LIFR defiziente Tiere sterben postnatal und sind offenbar auch etwas kleiner als ihre Geschwister aus demselben Wurf ((Ware et al., 1995)). CNTFR defiziente Tiere schließlich überleben maximal bis 21 Stunden nach Geburt, sind im Gegensatz zu LIFR oder gp130 defizienten Tieren jedoch nicht in ihrer Größe von wt Geschwistern unterscheidbar (DeChiara et al., 1995). Alle drei Knock out Stämme sind nicht in der Lage Muttermilch aufzunehmen. Da die Inaktivierung von gp130 auch eine Inaktivierung von LIFR und CNTFR zur Folge hat,

ist es wahrscheinlich, daß alle drei Knock out Stämme wegen motorischer Defekte postnatal nicht überleben können. Zusätzlich tritt bei einem Teil der gp130 defizienten Tieren der Tod in utero ein, wahrscheinlich als Folge der multiplen Defekte in mehreren Organen (Herz, Hämatopoese, Leber, metabolischer Defekt etc.) (Yoshida et al., 1996).

Die molekularen Mechanismen, die zur Wiederherstellung der Lebermasse nach Schädigung führen, sind sehr komplex. Ziel der aktuellen Arbeiten war die Klärung der intra- und extrazellulären Signalwege, die die Leberregeneration auf molekularer Ebene vermitteln (Fausto et al., 1995; Michalopoulos et al., 1997; Streetz et al., 2000).

Im zweiten Teil der hier vorgestellten Untersuchungen sollte die Rolle von IL-6 und gp130 für die Leberregeneration durch Experimente an konditionellen gp130 Knock out Mäusen untersucht werden. In diesen Mäusen ist das für die Transmembrandomäne codierende Exon 16 von zwei loxP Stellen flankiert. Durch die Expression einer aus dem Bakteriophagen P1 stammenden Cre-Rekombinase kann das Exon 16 deletiert werden, so daß kein funktioneller, membranständiger gp130 Rezeptor gebildet werden kann (Betz et al., 1998). Bei den verwendeten Tieren stand die Expression der Rekombinase unter der Kontrolle des Mx-Promotors (Kuhn et al., 1995). Dieser Promotor wird durch  $INF\alpha$  aktiviert. Bei den durchgeführten Experimenten wurde den Tieren doppelsträngige RNA (plpC) intraperitoneal injiziert, was eine virale Infektion simuliert und zur Freisetzung von endogenem  $INF\alpha$  führt. Durch den beschriebenen Versuchsansatz kann eine normale, unbeeinflusste Embryonalentwicklung gewährleistet werden, was von Bedeutung ist da gp130 Knock out Tiere in utero oder direkt nach Geburt sterben (Yoshida et al., 1996; Kawasaki et al., 1997).

Durch Southern-Blot-Untersuchungen und funktionelle Analysen wurden die besten Bedingungen für die geplanten Versuche ermittelt. Dabei konnte festgestellt werden, daß eine Menge von 40 µg plpC pro 20 g Maus zu einer effizienten Deletion des mit loxP Sequenzen flankierten Bereichs im gp130 Genlokus führte. Nach IL-6 Stimulation konnte bereits 7 Tage nach plpC Induktion keine Aktivierung der gp130 abhängigen Signalkaskaden mehr beobachtet werden. Um eine maximale Deletion

mit möglichst kompletter Ausschaltung der abhängigen Signalwege zu gewährleisten, wurde in der vorliegenden Arbeit zur Induktion eine plpC Dosis von 80 µg pro 20 g Maus und eine anschließende Wartezeit von 9 Tagen vor Experimentbeginn, gewählt. Bei den so gewählten Bedingungen konnte in der Leber mittels Southern-Blot kein gp130 wt-Gen mehr nachgewiesen werden. In den gp130 deletierten Tieren war nach IL-6 Stimulation die Stat3 Aktivierung vollkommen inhibiert. Da alle Mitglieder der IL-6 Zytokinfamilie den gp130 Rezeptor für die Signalweiterleitung benötigen, kann durch den Einsatz der hier verwendeten Tiere ausgeschlossen werden, daß einzelne Zytokine der Familie den Verlust eines anderen Mitglieds kompensieren können (Taga et al., 1997; Heinrich et al., 1998).

Nach partieller Hepatektomie scheint in der Leber nur eine kurze Zeitspanne für die Aktivierung gp130 abhängiger Signale von Bedeutung zu sein. In der Kontrollgruppe konnten maximale IL-6 Serumkonzentration nur bis 6 Stunden nach Operation nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war die starke Stat3 Aktivierung auf die erste Stunde nach Hepatektomie begrenzt. Aktuelle Versuche der Gruppe von N. Fausto geben eine molekulare Erklärung für diese Beobachtung (Campbell et al., 20001). Schon 1 Stunde nach partieller Hepatektomie wird SOCS-3 (suppressor of cytokine signaling 3) auf mRNA Ebene induziert und 2 Stunden post Hepatektomie wird die maximale Expressionsstärke erreicht. Durch die ansteigende Expression von SOCS-3 wird die STAT3 Aktivierung auf einen engen Zeitraum nach partieller Hepatektomie beschränkt.

Die Leberregeneration in den gp130 deletierten Tieren zeigte deutliche Unterschiede zu Kontrolltieren. Sowohl die STAT3 als auch die Aktivierung von Immediate Early Genen wie NFkB und AP-1 war in den Knock out Tieren komplett inhibiert. Diese Daten wurden zusätzlich in der durchgeführten Genarray Analyse bestätigt. Aufgrund dieser Befunde scheint c-myc ein gp130 abhängiges Zielgen zu sein, das während der Leberregeneration aktiviert wird. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit früheren Befunden, die andeuteten, daß bestimmte immediate early Gene in Abhängigkeit von IL-6 nach partieller Hepatektomie reguliert werden (Yamada et al., 1997; Cressman et al., 1996). In der angefertigten Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, daß diese Befunde keinen wesentlichen Einfluß auf die Zellzyklusprogression des Hepatozyten

nach partieller Hepatektomie haben. Die Array Daten werden durch Untersuchungen in IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen unterstützt (Li et al., 2001).

Die Experimente dieser Arbeit sprechen dafür, daß es kompensatorische Mechanismen in der Leber gibt durch die dieser Defekt ausgeglichen werden kann. Diese Ergebnisse waren im Kontext der bisherigen Veröffentlichungen unerwartet. Bei genauerer Betrachtung der Daten von Cressman et al. (1996), kann man jedoch feststellen, daß die dort verwendeten IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse, die eine partielle Hepatektomie überlebten, nach 5 Tagen ihre Lebermasse vollständig zurückgewonnen hatten. Diese Ergebnisse implizieren zwar eine Bedeutung von IL-6 während der Leberregeneration, doch scheint dieses Zytokin nicht absolut notwendig zu sein. Andernfalls wäre die beobachtete Regeneration in den überlebenden IL-6 Knock out Tieren nicht zu erklären. Zur Kontrolle wurde auch in dieser Arbeit die Regeneration in IL-6 Knock out Tieren untersucht. Die von Cressman et al. (1996) gefundenen Ergebnisse konnten in dieser Form nicht bestätigt werden. Bei den hier vorgenommenen Versuchen konnte kein Unterschied in der Proliferation der Hepatozyten nach partieller Hepatektomie zwischen den IL-6 Knock out Mäusen und wt Kontrollen gefunden werden. Diese Beobachtung wird durch Berichte aus der Arbeitsgruppe um Demitrio, die ebenfalls IL-6<sup>-/-</sup> Tiere verwendeten, unterstützt (Sakamoto et al., 1999). Diese Gruppe konnte zeigen, daß nach partieller Hepatektomie in den IL-6 deletierten Mäusen eine normale Leberregeneration stattfand. In ihrer Untersuchung, wie auch in den hier vorgelegten Daten, konnte nur eine sehr geringe Reduktion der DNA-Synthese der Hepatozyten nach Operation festgestellt werden.

Die Unterschiede in den Ergebnissen mit IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen von verschiedenen Gruppen sind offensichtlich. Konditionale gp130 Knock out Tiere, bei denen die Cre-Rekombinase unter dem Einfluß des Albuminpromotors steht, was zu einer Hepatozyten spezifischen Deletion von gp130 am Ende der Embryonalentwicklung führt, zeigen eine normale Zunahme des Lebergewichts nach Geburt (Streetz, AASLD Abstract 2001). Auch diese Ergebnisse zeigen, daß zumindest nach der primären embryonalen Anlage der Leber die IL-6 Zytokinfamilie keinen direkten Einfluß auf den Zellzyklus der Hepatozyten ausüben. Im Rahmen der Arbeiten mit den Alb-Cre Tieren konnte auch nach einmaliger Tetrachlorkohlenstoff Gabe gezeigt

werden, daß nach der Schädigung die Hepatozyten die Leber normal regeneriert (Streetz, AASLD Abstract 2001).

Auf Grund dieser Widersprüche war es schwierig, die wirkliche Rolle von IL-6 und gp130 abhängiger Signalwege für die Leberregeneration zu definieren. Deshalb müßten andere Erklärungen für den Einfluß von IL-6 auf den Zellzyklus nach Hepatektomie gefunden werden. Neuere Ergebnisse zeigen einen protektiven und antiapoptotischen Effekt von IL-6 in Hepatozyten (Kovalovich et al., 2001; Galun et al., 2000; Selzner et al., 1999). Bei Betrachtung all dieser Ergebnisse wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß die Rolle von IL-6 und der gp130 abhängigen Signalwege nicht primär in der Regulation des Zellzyklus liegt, sondern eher im Schutz der Leber gegen weitere Schädigungen während der Regeneration. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß bei konditionalen gp130 Knock out Tieren die Aktivierung der Akut-Phase-Antwort und damit dieser frühe Schutzmechanismus der Leber nach Hepatektomie ausbleibt. Die Akut Phase Proteine werden primär in den Hepatozyten synthetisiert und erfüllen vielfältige Aufgaben. Diese Proteine dienen der Pathogenabwehr, der Wundheilung, der Proteaseinhibition und dem Schutz vor reaktiven Radikalen.

Zur Simulation einer bakteriellen Infektion wurde den Tieren nach partieller Hepatektomie LPS injiziert. Diese Versuche zeigten deutliche Unterschiede zwischen den konditionalen gp130 Knock out Tieren und den Kontrollen. Die in den gp130 deletierten Tieren gefundene Überlebensrate nach Operation und LPS Injektion, sowie deren Proliferationsrate in der Leber zeigten eine gute Übereinstimmung mit den von Cressman 1996 publizierten Ergebnissen in den IL-6<sup>-/-</sup> Tieren. Ein analoger Phänotyp wurde auch in den IL-6 Knock out Tieren nach LPS Gabe und partieller Hepatektomie gefunden.

Die im Rahmen der Arbeit erhobenen Befunde führen daher zu einer neuen Definition der Bedeutung IL-6/gp130 abhängiger Signalwege während der Leberregeneration. Die höheren IL-6 Serumkonzentrationen nach partieller Hepatektomie sind demnach wichtig, um protektive Signalwege zu aktivieren, die den Hepatozyten weniger anfällig gegenüber Streß induzierten Signalen, wie z.B. einer bakteriellen Infektion nach Hepatektomie, machen. Hingegen scheinen die gp130

vermittelten Signale keinen direkten Einfluß auf die Zellproliferation über die Regulation von Zellzyklusgenen zu besitzen. Deshalb muß man schließen, daß der Phänotyp der gp130 wie auch der IL-6 deletierten Tiere nach Hepatektomie von der Stärke der Leberschädigung und zusätzlich von anderen Faktoren, wie z.B. bakteriellen Infektionen, dem Gesundheitszustand der Mauskolonie und dem genetischem Hintergrund, abhängig ist.

Neuere Befunde deuten auf eine mögliche Anti-apoptotische Rolle von IL-6 in der Leber hin (Kovalovich et al., 2001). Kovalovich et al. (2001) zeigten, daß IL-6 gegen Fas induzierte Apoptose durch die Induktion einer kritischen Konzentration der anti-apoptotischen Proteine FLIP, BCL-2 und Bcl-xL in Hepatozyten schützt. Interessanterweise ist eine akute Leberschädigung in IL-6<sup>-/-</sup> Lebern nach partieller Hepatektomie nicht mit einer erhöhten Hepatozytenapoptose assoziiert (Cressman et al., 1996; Kovalovich et al., 2000). Das Zytokin IL-6 ist auch in der Lage, der akuten toxischen Leberschädigungen entgegenzuwirken. Nach einer einzigen Injektion von Tetrachlorkohlenstoff (CCl<sub>4</sub>) zeigten sich in der Leber von IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen eine erhöhte hepatozelluläre Schädigung und Defekte in der proliferativen Antwort der Hepatozyten. Dieser Phänotyp war mit einer deutlichen Beeinträchtigung der STAT3 und NFκB Aktivierung und einer reduzierten DNA Synthese in Hepatozyten verbunden. Eine ähnliche Beeinträchtigung der STAT3 und NFκB Aktivierung konnte in der aktuellen Arbeit unter Verwendung konditionaler gp130 Knock out Tieren nach partieller Hepatektomie gezeigt werden. Mit der Tetrachlorkohlenstoffbehandlung war in den IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen auch eine erhöhte Apoptoserate von Hepatozyten assoziiert. Wenn die Tiere vor der Toxinbehandlung IL-6 verabreicht bekamen, konnte die CCl<sub>4</sub> induzierte Schädigung und Apoptose reduziert werden. Außerdem wurde eine beschleunigte Regeneration sowohl in IL-6<sup>+/+</sup> als auch in IL-6<sup>-/-</sup> Lebern festgestellt (Kovalovich et al., 2000). Das Modell der CCl<sub>4</sub> Leberschädigung ist auch mit erhöhten Serumwerten für TNFα assoziiert, was mit einer Verstärkung der Schädigung und einer Unterstützung der Apoptose von Hepatozyten in Zusammenhang steht (Czaja et al., 1995). Es ist hervorzuheben, daß die in dieser Arbeit erhobenen Daten z.B. der Aktivierung der immediate early Gene mit den eben diskutierten Daten weitgehend übereinstimmen. Erst nach LPS Gabe kommt es zur Induktion von Apoptose und die Schutzmechanismen versagen in den IL-6 und konditionalen gp130 Knock out Tieren. Ein kritischer Schritt, über den IL-6 protektive

Mechanismen aktiviert, ist wahrscheinlich die Modulation von FLIP, dem dominant negativen Inhibitor von Kaspase 8. Die Inaktivierung der Kaspase 8 blockiert den apoptotischen Fas Signalweg proximal, d.h. vor der Depolarisation der mitochondrialen Membran und der Aktivierung der finalen Kaspasen. Da FLIP auch an FADD binden kann, wird die Apoptose von allen Todesrezeptoren, die FADD und Kaspase 8 zur Aktivierung der Signalkaskade benötigen (z.B. FAS, DR-3, DR-4 und TNFR-1), behindert.

Die Bedeutung von gp130 für die Leberregeneration ist nach den hier vorgestellten Daten im Bereich der Regulation von Schutzmechanismen, und der Beeinflussung des Immunsystems zu sehen. Interessanterweise sind die in den gp130 loxP (+/+)/MxCre (+) Mäusen festgestellten Defekte im Immunsystem (Betz et al., 1998) nicht stärker ausgeprägt als die der IL-6 defizienten Mäusen, bezogen auf die T-Zellzahl, die Serumantikörperkonzentration im Grundzustand und die Antikörperproduktion nach Immunisierung. Offensichtlich ist IL-6 das Zytokin der gp130 abhängigen Familie, welches im Immunsystem eine dominante Rolle spielt. Andere Mitglieder dieser Familie scheinen dagegen eine untergeordnete Bedeutung in der Regulation der Immunität zu besitzen. In LIF defizienten Tieren ist die Proliferation von Thymozyten nach mitotischer Aktivierung verringert (Ecary et al., 1993), dieser Effekt konnte aber in Thymozyten, welche eine dominant negative Mutante von gp130 exprimierten, nicht gefunden werden (Kumanogoh et al., 1997). Bei der Betrachtung des Expressionsmusters anderer Zytokine und Rezeptoren der Familie müssen spezifische Mechanismen dieser Mitglieder diskutiert werden. LIFR ist auf einem kleinen Anteil der Lymphozyten exprimiert, findet sich jedoch zusätzlich auf Monozyten und Makrophagen (Hilton et al., 1991; Mosley et al., 1996). OSM wird spezifisch von aktivierten T-Zellen und Makrophagen produziert (Rose und Bruce, 1991) und eine IL-11R Expression findet sich im Thymus, in Lymphknoten und der Milz (Bilinski et al., 1996). Auch in LIF und OSM transgenen Mäusen traten das Immunsystem betreffende Defekte auf. So war die Architektur von Thymus und Milz deutlich gestört (Clegg et al., 1996; Shen et al., 1994).

Die Bedeutung von IL-6 für die Leber konnte bislang nur unter Stressbedingungen eruiert werden, wie nach Induktion einer begrenzten Gewebeschädigung durch subcutane Terpentininjektion, nach intraperitonealer Injektion von LPS oder nach

partieller Hepatektomie (Kopf et al., 1994; Fattori et al., 1994; Cressman et al., 1996). Alle gp130 abhängigen Zytokine sind in der Lage, die Synthese von Akut-Phase-Proteinen zu triggern, zusätzlich sind hierzu IL-1, TNF  $\alpha$  und Glucocorticoide (Baumann und Gauldie, 1990; Benigni et al., 1996) in der Lage. In IL-6 defizienten Mäusen war die Produktion von Akut-Phase-Proteinen nach subcutaner Terpentininjektion drastisch eingeschränkt, wohingegen nach LPS-Applikation nur ein leichter Rückgang beobachtet wurde (Fattori et al., 1994; Kopf et al., 1994). In der Abwesenheit von gp130 konnte hingegen nach partieller Hepatektomie keine Induktion der Akut-Phase-Gene beobachtet werden (s. Ergebnisse). Die beeinträchtigte Induktion der Akut-Phase-Gene als eines der frühesten Verteidigungssysteme spielt wahrscheinlich eine wesentliche Rolle für den beobachteten Phänotyp nach LPS Stimulation und partieller Hepatektomie.

Neben der fehlenden Regulation der Akut-Phase-Gene könnte die erhöhte Letalität der beiden Knock out Stämme nach partieller Hepatektomie auch durch Veränderungen in der Regulation des Immunsystems erklärt werden. In der initialen Arbeit konnten Betz et al. zeigen, daß der gp130-Rezeptor in Zellen des Knochenmarks, Thymus und der Milz zu über 90% deletiert vorliegt. Für IL-6 defiziente Tiere sind mehrere Studien publiziert worden, die eine erhöhte Infektionssuszeptibilität gegen eine Vielzahl von Pathogenen zeigen (z.B. Dalrymple et al., 1995; Romani et al., 1996; Suzuki et al., 1997; Moskowitz et al., 1997; Ladel et al., 1997). Diese erhöhte Suszeptibilität könnte durch verschiedene Faktoren verursacht sein: 1) eine verringerte Antikörperantwort (Kopf et al., 1994; Ramsay et al., 1994), 2) ein  $T_H1/T_H2$  Shift (geringere Produktion von IFN  $\gamma$  (Romani et al., 1996; Suzuki et al., 1997; Ladel et al., 1997), 3) verringerte Generierung und Aktivität zytotoxischer Lymphozyten (Kopf et al., 1994), 4) fehlende Fibrininduktion (Chai et al., 1996), 5) verringerte Einwanderung von neutrophilen Granulozyten ins Blut nach Infektionen (Dalrymple et al., 1995; Romani et al., 1996).

Die bei den IL-6 Knock out Mäusen gefundenen Defekte sind ebenso in den gp130 deletierten Mäusen zu finden, so daß diese Effekte zusätzlich eine Ursache für den Verlauf nach LPS Injektion und partieller Hepatektomie sein könnten.

Die IL-6-Hyperstimulationsexperimente zeigen eine Verzögerung der Proliferation von Hepatozyten nach partieller Hepatektomie. Hingegen konnte bei den Experimenten mit konditionellen gp130 Knock out Tieren keine gp130 abhängige direkte Beeinflussung der Proliferation und der Zellzyklusmarker gefunden werden. Auch die in diesem Rahmen unternommenen Array Untersuchungen zeigen keine direkte Rolle auf die Regulation zellzyklusrelevanter Gene. Die Array Untersuchungen beschränkten sich auf wenige Zeitpunkte, daher kann nicht sicher ausgeschlossen werden, daß dadurch die Regulation einiger Gene nicht erkannt wurde. Zusätzlich müssen post-transkriptionelle Mechanismen diskutiert werden.

Bei der Betrachtung der ganzen Veröffentlichungen zeigt sich ein sehr widersprüchliches Bild bezüglich der Funktion und der Wirkung der IL-6/gp130 abhängigen Signalwege. Dabei ist zu berücksichtigen, daß jede der durchgeführten Untersuchungen letztlich auch einen Eingriff in das normale biologische System darstellt, und deshalb jede gewonnene Aussage kritisch zu betrachten ist. In einer erst vor kurzem erschienenen Veröffentlichung konnte jedoch eine Verbindung zwischen IL-6 und der Zellproliferation aufgezeigt werden. Dabei interagiert ein  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 induzierbares Protein mit der kleinen Untereinheit der DNA Polymerase  $\delta$  und PCNA (He et al., 2001). Interessanterweise scheinen gp130 abhängige Mechanismen auch teilweise zelltypspezifisch und entwicklungspezifisch unterschiedliche Wirkungen in Bezug auf Differenzierungsvorgänge und Zellteilung zu besitzen (Runge et al., 1998; Niwa et al., 1998, Matsuda et al., 1999; Yamanaka et al., 1996; Schumann et al., 1999).

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit die Rolle IL-6/gp130-abhängiger Signalwege für die Leberregeneration genauer definiert werden. Die Befunde sprechen dafür, daß eine IL-6-Überstimulation die Zellzyklusprogression nach partieller Hepatektomie hemmt, während eine Deletion des gp130 Rezeptors erst relevant wird, wenn zusätzliche Faktoren, wie z.B. eine bakterielle Infektion einen Stress auf die regenerierende Leber ausüben. Daher scheint der IL-6/gp130-Signalweg vorwiegend eine protektive Rolle für den regenerierenden Hepatozyten während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie zu haben.

## 5 Zusammenfassung

Aufgrund von Vorarbeiten wurde angenommen, daß der IL-6/gp130 Signalweg für den Ablauf der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie eine zentrale Rolle einnimmt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Bedeutung der IL-6/gp130 Signalkaskaden für die Leberregeneration genauer charakterisiert werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine transgene Maus verwendet die hepatozyten-spezifisch den löslichen humanen IL-6 Rezeptor überexprimiert. Nach Stimulation mit humanem IL-6 kommt es zu einer Überstimulation der gp130-abhängigen Signalkaskaden in Hepatozyten. Dieser Mechanismus wurde genutzt, um den Einfluß einer Hyperstimulation gp130-abhängiger Signalwege auf den Verlauf der Leberregeneration zu untersuchen. Die verlängerte Aktivierung der gp130-abhängigen Signalwege nach partieller Hepatektomie resultierte in einer verzögerten und verringerten Regeneration der Leber. Während die Anzahl replizierender Hepatozyten verringert war (BrdU Assay, Zyklin A und E Expression), kam es zu einer vermehrten Expression von Zellzyklusinhibitoren (p21, p27). Diese Ergebnisse sprechen für einen dosisabhängigen Einfluß der IL-6 Stimulation auf die Leberregeneration, wobei eine IL-6 Hyperstimulation den Regenerationsvorgang hemmt.

Im zweiten Teil wurde der Ansatz des konditionalen Knockout Modells gewählt, um das zentrale Signalmolekül der IL-6 Familie gp130 induzierbar in der Leber zu deletieren. Nach gp130 Deletion ist die Stat3 Aktivierung und Induktion der Akut-Phase Reaktion in der Leber blockiert. Zusätzlich werden die Immediate Early Gene AP1 und NFkB deutlich verspätet aktiviert. Die gp130 Deletion hatte jedoch keinen Einfluß auf die Proliferation der Hepatozyten nach partieller Hepatektomie. Zusätzliche Array-Analysen ergaben ebenfalls keine Veränderung in der Expression Zellzyklus-relevanter Gene. Da der Induktion der Akut-Phase-Antwort in Hepatozyten eine protektive Wirkung zukommt, wurden die gp130 deletierten Tiere nach partieller Hepatektomie zusätzlich mit LPS behandelt. Dies hatte eine signifikant reduzierte Proliferation der Hepatozyten und eine erhöhte Sterblichkeit der Tiere zur Folge. Analoge Befunde konnten in IL-6 Knock out Tieren erhoben werden.

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit die Rolle IL-6/gp130-abhängiger Signalwege für die Leberregeneration genauer definiert werden. Die Befunde sprechen dafür, daß eine IL-6-Überstimulation die Zellzyklusprogression nach partieller Hepatektomie hemmt, während eine Deletion des gp130 Rezeptors erst relevant wird, wenn zusätzliche Faktoren, wie z.B. eine bakterielle Infektion einen Stress auf die regenerierende Leber ausüben. Daher scheint der IL-6/gp130-Signalweg vorwiegend eine protektive Rolle für den regenerierenden Hepatozyten während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie zu haben.

## 6 Literatur

Adams P.D., Kaelin W.G. Jr. (1995): Transcriptional control by E2F. *Semin Cancer Biol.* 6(2):99-108. Review.

Akira S., Isshiki H., Takahisa S., Tanabe O., Kinoshita S., Nishio Y., Nakajima T. et al. (1990): A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL-6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.* 9: 1897-1906

Akira S., Kishimoto T. (1992): IL-6 and NF-IL-6 in acute-phase response and viral infection. *Immunological Reviews* 127: 25-50

Akira S., Taga T., Kishimoto T. (1993): Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol.* 54: 1-78

Akira S., Yoshida K., Tanaka T., Taga T., Kishimoto T. (1995): Targeted disruption of the IL-6 related genes: gp130 and NF-IL-6. *Immunol. Rev.* 148: 221-253

Alonzi T., Fattori E., Lazzaro D., Costa P., Probert L., Kollias G., De Benedetti F., Poli V., Ciliberto G. (1998): Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J. Exp. Med.* 187: 461-468

Baldin V., Lukas J., Marcote M.J., Pagano M., Draetta G. (1993): Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G<sub>1</sub>. *Genes & Dev.* 7: 812-821

Baroja M.L., Sirit F.L., Rivera H., Garzaro J., Bianco N.E. Machado I.V. (1996): T cell hyperreactivity to IL-6 in chronic nonviremic HBV carriers despite normal IL-6 receptor or gp130 expression. *Viral. Immunol.* 9: 187-194

Barone M.V., Crozat A., Tabae A., Philipson L., Ron D. (1994): CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G<sub>1</sub>/S arrest. *Gen. Dev.* 8: 453-464

Bauer J., Bauer T., Kalb T., Taga T., Lengyel G., Hirano T., Kishimoto T., Acs G., Mayer L., Gerok W. (1989): Regulation of interleukin-6 receptor expression in human monocytes and monocyte-derived macrophages. *J. Exp. Med.* 170: 147-159

Bauer J., Herrmann F. (1991): Interleukin-6 in clinical medicine. *Ann. Hematol.* 62: 203-210

Baumann H., Gauldie J. (1990): Regulation of the hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol. Biol. Med.* 7: 147-159

Baumann H., Gauldie J. (1994): The acute phase response. *Immunology Today* 15:74-80

Bazan J.F. (1989): A novel family of growth factor receptor: A common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-6 receptor chain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 164: 788-795

Bazan J.F. (1990): Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6934-6938

Bazan J.F. (1992): Neurotropic cytokines in the hematopoietic fold. *Neuron* 7: 1-12

Bellido T., Jilka R.L., Boyce B.F., Girasole G., Broxmeyer H., Dalrymple S.A., Murray R., Manolagas S.C. (1995): Regulation of interleukin-6 osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. *J. Clin. Invest.* 95: 2286-2895

Bellido T., O'Brien C.A., Roberson P.K., Manolagas S.C. (1998): Transcriptional activation of the p21(WAF1, CIP1, SD11) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 273: 21137-21144

Benigni F., Fantuzzi G., Sacco S., Sironi M., Pozzi P., Dinarello C.A., Sipe J.D., Poli V., Cappelletti M., Paonessa G., Pennica D., Panayotatos N., Ghezzi P. (1996): Six different cytokines that share gp130 as a receptor subunit, induce serum amyloid A and potentiate the induction of interleukin-6 and the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by interleukin-1. *Blood* 87: 1851-1854

Bernad A., Kopf M., Kulbacki R., Weich N., Koehler G., Gutierrez-Ramos J.C. (1994): Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. *Immunity* 1: 725-731

Betz U.A., Bloch W., van den Broek M., Yoshida K., Taga T., Kishimoto T., Addicks K., Rajewsky K., Muller W. (1998): Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, cardiac, hematopoietic, immunological, hepatic, and pulmonary defects. *J. Exp. Med.* 188(10): 1955-65

Bilinski P., Hall M.A., Neuhaus H., Gissel C., Heath J.K., Gossler A. (1996): Two differentially expressed interleukin-11 receptor genes in the mouse genome. *Biochem. J.* 320: 359-363

Block G.D., Locker J., Bowen W.C., Petersen B.E., Katyal S., Strom S.C., Riley T., Howard T.A., Michalopoulos G.K. (1996): Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol.* 132(6):1133-49.

Bluethmann H., Rothe J., Schultze N., Thachuk M., Koebel P. (1994): Establishment of the role of IL-6 and TNF receptor 1 using gene knockout mice. *J. Leuk. Biol.* 56: 565-570

Bonney R.J., Walker P.R., Potter V.R. (1973): Isoenzyme patterns in parenchymal and non-parenchymal cells isolated from regenerating and regenerated rat liver. *Biochem J.* 136(4):947-54.

Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254

Bravo J., Staunton D., Heath J.K., Jones E.Y. (1998): Crystal structure of a cytokine-binding region of gp130. *EMBO J.* 17: 1665-1674

Brett F.M., Mizisin A.P., Powell H.C., Campbell I.L. (1995): Evolution of neuropathologic abnormalities associated with blood-brain barrier breakdown in transgenic mice expressing interleukin-6 in astrocytes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54: 766-775

Bromberg J.F., Wrzeszczynska M.H., Devgan G., Zhao Y., Pestell R.G., Albanese C., Darnell J.E. (1999): Stat3 as an oncogene. *Cell* 98: 295-303

Buck M., Turler H., Chojkier M. (1994): LAP (NF-IL-6), a tissue-specific transcriptional activator, is an inhibitor of hepatoma cell proliferation. *EMBO J.* 13: 851-860

Burger R., Neipel F., Fleckenstein B., Savino R., Ciliberto G., Kalden J.R., Gramatzki M. (1998): Human herpesvirus type 8 interleukin-6 homologue is functionally active on human myeloma cells. *Blood* 91: 1853-1863

Campbell I.L., Abraham C.R., Masliah E., Kemper P., Inglis J.D., Oldstone M.B., Mucke L. (1993): Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10061-10065

Campbell J.S., Prichard L., Schaper F., Schmitz J., Stephenson-Famy A., Rosenfeld M.E., Argast G.M., Heinrich P.C., Fausto N. (2001): Expression of suppressor of cytokine signaling during liver regeneration. *J. Clin. Invest.* 107(10): 1285-92

Chai Z., Gatti S., Toniatti C., Poli V., Bartfai T (1996): Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *J. Exp. Med.* 183: 311-316

Cheng M., Sexl V., Sherr C.J., Roussel M.F. (1998): Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27/Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1091-6

Chinery R., Brockman J.A., Peeler M.O., Shyr Y., Beauchamp R.D., Coffey R.J. (1997): Antioxidants enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in colorectal cancer: a p53-independent induction of p21WAF1/CIP1 via C/EBPbeta. *Nat. Med.* 3: 1233-1241

Chung C.D., Liao J., Liu B., Rao X., Jay P., Berta P., Shuai K. (1997): Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278: 1803-1805

Church G.M., Gilbert W. (1984): Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991-1995

Clegg C.H., Rulffes J.T., Wallace P.M., Haugen H.S. (1996): Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M. *Nature* 384: 261-263

Cordon-Cardo C. (1995): Mutation of Cell Cycle Regulators: Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am. J. Path.* 147: 545-560

Coulie P., Stevens M., VanSnick J. (1989): High- and low-affinity receptors for murine interleukin-6: Distribution on B and T cells. *Eur. J. Immunol.* 19: 2107-2114

Cressman D.E., Greenbaum L.E., Haber B.A., Taub R. (1994): Rapid activation of post-hepatectomy factor/nuclear factor kappa B in hepatocytes, a primary response in the regenerating liver. *J Biol Chem.* 269(48):30429-35.

Cressman D.E., Diamond R.H., Taub R. (1995): Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology* 21: 1443-1449

Cressmann D.E., Greenbaum L.E., DeAngelis R.A., Ciliberto G., Furth E.E., Poli V., Taub R. (1996): Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin 6-deficient mice. *Science* 274: 1379- 1383

Czaja M.J., Xu J., Alt E. (1995): Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor. *Gastroenterology* 108(6):1849-54.

Dalrymple S.A., Lucian L.A., Slattery R., McNeil T., Aud D.M. Fuchino S., Lee F., Murray R. (1995): Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: Correlation with inefficient neutrophilia. *Infect. Immun.* 63: 2262-2268

Deng C., Zhang P., Harper J.W., Elledge S.J., Leder P. (1995): Mice lacking p21<sup>CIP1</sup><sub>WAF1</sub> undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82: 675-84

DeChiara T., Vejsada R., Poueymirou W.T., Acheson A., Suri C., Conover J.C., Friedman B., McClain J., Pan L., Stahl N., Ip N., Kato A., Yancopoulos G. (1995): Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* 83: 313-322

de Hemptinne B., Lorge F., Kestens P.J., Lambotte L. (1985): [Hepatocellular hyperpolarizing factors and regeneration after partial hepatectomy in the rat] *Acta Gastroenterol Belg.* 48(4):424-31.

Descombes P., Chojikier M., Lichtsteiner S., Falvey E., 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

Diamant M., Rieneck K., Mechti N., Zhang X.G., Svenson M., Bendtzen K., Klein B. (1997): Cloning and expression of an alternatively spliced mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 signal transducer gp130. *FEBS Lett.* 412: 379-384

Diehl A.M., Yin M., Fleckenstein J., Yang S.Q., Lin H.Z., Brenner D.A., Westwick J., Bagby G., Nelson S. (1994): Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces c-jun during the regenerative response to liver injury. *Am. J. Physiol.* 267: G552-561

Ditterich E., Haft C.R., Muys L., Heinrich P.C., Graeve L. (1996): A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor. *J. Biol. Chem.* 271: 5487-5494

Dowdy S.F., Hinds P.W., Louie K., Reed S.I., Arnold A., Weinberg R.A. (1993): Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 7;73(3):499-511

Dulic V., Lees E., Reed S.I. (1992): Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 267: 1958-1961

Ehrenfried J.A., Ko T.C., Thompson E.A., Evers B.M. (1997): Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration. *Surgery* 122: 927-935

Ekholm S.V., Zickert P., Reed S.I., Zetterberg A. (2001): Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. *Mol. Cell. Biol.* 21(9): 3256-3265

EI-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parson R., Trent J.M. et al. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817-25

Ernst M., Novak U., Nicholson S.E., Layton J.E., Dunn A.R. (1999): The carboxyl-terminal domains of gp130-related cytokine receptors are necessary for suppressing embryonic stem cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 274(14): 9729-9737

Escary J-L., Perreau J., Duménil D., Ezine S., Brûlet P. (1993) : Leukemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature* 363: 361-364

Ewen M. E., Sluss H.K., Sherr C.J., Matsushime H., Kato J.-Y., Livingston D.M. (1993): Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73: 487-497

Falus A., Biro J., Rakasz E., Brunner T., Bischoff S. (1994): Separate regulation of a membrane protein, gp130, present in receptor complex specific for interleukin-6 and other functionally related cytokines. *J. Mol. Recognit.* 7: 277-281

Fattori E., Cappelletti M., Costa P., Sellitto C., Cantoni L., Carelli M., Faggioni R., Fantuzzi G., Ghezzi P., Poli V. (1994): Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *J. Exp. Med.* 180: 1243-1250

Fausto N., Mead J.E., Braun L., Thompson N.L., Panzica M., Goyette M., Bell G.I., Shank P.R. (1986): Proto-oncogene expression and growth factors during liver regeneration. *Symp Fundam Cancer Res.* 39:69-86. Review.

Fausto N., Laird A.D., Webber E.M. (1995): Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J.* 9(15): 1527-36

Feinberg A.P., Vogelstein B. (1984): Addendum: a technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137: 266-267

Fero M.L., Rivkin M., Tasch M., Porter P., Carow C.E., Firpo E. et al. (1996): A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27<sup>Kip1</sup>-deficient mice. *Cell* 85: 733-44

Fischer M., Goldschmitt J., Peschel C., Brakenhoff J.P.G., Kallen K-J., Wollmer A., Grötzing J., Rose-John S. (1997): A designer cytokine with high activity on human hematopoietic progenitor cells. *Nature Biotechnol.* 15: 142-145

Florenes V.A., Lu C., Bhattacharya N., Rak J., Sheehan C., Slingerland J.M., Kerbel R.S. (1999): Interleukin-6 dependent induction of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 is lost during progression of human malignant melanoma. *Oncogene* 18: 1023-1032

Flores-Rozas H., Kelman Z., Dean F.B., Pan Z.Q., Harper J.W., Elledge S.J. et al. (1994): Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8655-9

Fukada T., Hibi M., Yamanaka Y., Takahashi-Tezuka M., Fujitani Y., Yamaguchi T., Nakajima K., Hirano T. (1996): Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 5: 449-460

Fukada T., Ohtani T., Yoshida Y., Shirogane T., Nishida K., Nakajima K., Hibi M. et al. (1998): STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. *EMBO J.* 17: 6670-6677

Galun E., Zeira E., Pappo O., Peters M., Rose-John S. (2000): Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury. *FASEB J.* 14(13): 1979-97

Gearing D.P., Comeau M.R., Friend D.J., Gimpel S.D., Thut C.J., McGourty J., Brasher K.K., King J.A., Gillis S., Mosley B., Ziegler S.F., Cosman D. (1992): The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 255: 1434-1437

Graeve L., Korolenko T.A., Hemmann U., Weiergraber O., Dittrich E., Heinrich P.C. (1996): A complex of the soluble interleukin-6 is internalized via the signal transducer gp130. *FEBS Lett.* 399: 131-134

Gudas J.M., Payton M., Thukral S., Chen E., Bass M., Robinson M.O., Coats S. (1999): Cyclin E2, a novel G1 cyclin that binds Cdk2 and is aberrantly expressed in human cancers. *Mol Cell Biol.* 19(1):612-22.

Haegemann G., Content J., Volckaert G., Derynck R., Tavernier J., Fiers W. (1986): Structural analysis of the sequence encoding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts. *Eur. J. Biochem.* 159: 625-632

Harper J., Adami G.R., Wei N., Keyomari K., Elledge S.J. (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of the cyclin D-dependent kinases. *Cell* 75: 805-16

He H., Tan C-K., Downey K.M., So A.G. (2001): A tumor necrosis factor  $\alpha$ - and interleukin 6-inducible protein that interacts with the small subunit of DNA polymerase  $\delta$  and proliferating cell nuclear antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(21): 11979-84

Heinrich P.C., Castell J.V., Andus T. (1990): Interleukin -6 and the acute phase response. *Biochem. J.* 265: 62-636

Heinrich P.C., Behrmann I., Muller-Newen G., Schaper F., Graeve L. (1998): Interleukin-6-type cytokine signaling through the gp30/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 334(Pt2): 297-314

Heaney M.L., Golde D.W. (1996): Soluble cytokine receptors. *Blood* 87: 847-857

Hibi M., Murakami M., Saito M., Hirano T., Taga T., Kishimoto T. (1990): Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 63: 1149-1157

Higgins G.M., Anderson R.M. (1931): Experimental pathology of liver. I. Restoration of liver of white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* 12: 186-202

Hilbert D.M., Kopf M., Mock B.A., Köhler G., Rudikoff S. (1995): Interleukin 6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms. *J. Exp. Med.* 182: 243-248

Hilton D.J., Gough N.M. (1991): Leukemia inhibitory factor: a biological perspective. *J. Cell. Biochem.* 46: 21-26

Hilton D.J., Nicola N.A, Metcalf D. (1991): Distribution and comparison of receptors for leukemia inhibitory factor in murine hemopoietic and hepatic cells. *J. Cell. Physiol.* 146: 207-215

Hirano T., Yasukawa K., Harada H., Taga T., Watanabe Y., Matsud T., Kashiwamura S., Nakajima K., Koyama K., Iwamatsu A., A., Tsunasawa S., Sakiyama F., Matsui H., Takahara Y., Taniguchi T., Kishimoto T. (1986): Complementary DNA of the novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324: 73-76

Hirano T. (1992): The biology of interleukin 6. *Chemical Immunology* 51: 153-180

Hirano T. (1994): Interleukin-6. In: *The Cytokine Handbook*. Thompson A. (ed) London: Academic press, 145-168

Hirata Y., Taga T., Hibi M., Nakano N., Hirano T., Kishimoto T. (1989): Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Cell. Physiol.* 146: 207-215

- Hirota H., Yoshida K., Kishimoto T., Taga T. (1995): Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4862-4866
- Hirota H., Kiyama H., Kishimoto T., Taga T. (1996): Accelerated nerve regeneration in mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *J. Exp. Med.* 183: 2627-2634
- Hsu J.C., Laz T., Mohn K.L., Taub R. (1991): Identification of LRF-1, a leucine-zipper protein that is rapidly and highly induced in regenerating liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(9):3511-5.
- Harper J.W., Elledge S.J., Keyomarsi K., Dynlacht B., Tsai L-H., Zhang P. et al (1995): Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell* 6: 387-400
- Ihara S., Nakajima K., Fukada T., Hibi M., Nagata S., Hirano T., Fukui Y. (1997): Dual control of neurite outgrowth by STAT3 and MAP kinase in PC12 cells stimulated with interleukin-6. *EMBO J.* 16: 5345-5352
- Inoue M., Minami M., Matsumoto M., Kishimoto T., Akira S. (1997): The amino acid residues immediately carboxyl-terminal to the tyrosine phosphorylation site contribute to interleukin 6-specific activation of signal transducer and activator of transcription 3. *J. Biol. Chem.* 272(14): 9550-9555
- Ishiyama T., Koike M., Nakamura S., Kishimoto T., Akimoto Y., Tsuruoka N. (1996): Interleukin-6 receptor expression in the peripheral B cells of patients with multicentric Castleman's disease. *Ann. Hematol.* 73: 179-182
- Jaumot M., Estranyol J.M., Serratos J., Agell N., Bachs O. (1999): Activation of cdk4 and cdk2 during rat liver regeneration is associated with intranuclear rearrangements of cyclin-cdk complexes. *Hepatology* 29: 385-395
- Kakumu S., Fukatsu A., Shinagawa T., Kurokawa S., Kusakabe A. (1992): Localisation of intrahepatic interleukin 6 in patients with acute and chronic liver disease. *J. Clin. Pathol.* 45: 408-411
- Kamiya A., Kinoshita T., Ito Y., Matsui T., Morikawa Y., Senba E., Nakashima K. et al. (1999): Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J.* 18: 2127-2136
- Kato J.-Y., Matsushime H., Hiebert S.W., Ewen M.E., Shen C.J. (1993): Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase, CDK4. *Genes & Dev.* 7: 331-342
- Kawasaki K., Gao Y-H., Yokose S., Kaji Y., Nakamura T., Suda T., Yoshida K., Taga T., Kishimoto T., Kataoka H., Yuasa T., Norimatsu H., Yamaguchi A. (1997): Osteoclasts are present in gp130-deficient mice. *Endocrinology* 138: 4959-4965

Kim H., Baumann H. (1999): Dual signaling of the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in regulating expression of acute-phase plasma proteins by interleukin-6 cytokine receptors in hepatic cells. *Mol. Cell. Biol.* 19: 5326-5338

Kinoshita T., Sekiguchi T., Xu M-J., Ito Y., Kamiya A., Tsuji K-I., Nakahata T. et al. (1999): Hepatic differentiation by oncostatin M attenuates fetal liver hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7265-7270

Kishimoto T. (1989): The biology of interleukin-6. *Blood* 74: 1-10

Kishimoto T., Akira S., Taga T. (1992): Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 258: 593-597

Kishimoto T., Taga T., Akira S. (1994): Cytokine signal transduction. *Cell* 76: 253-262

Kishimoto T., Akira S., Narazaki M., Taga T. (1995): Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86: 1243-1254

Klein M.A., Moller J.C., Jones L.L., Bluethmann H., Kreutzberg G.W., Raivich G. (1997): Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia* 19: 227-233

Kobayashi I., Matsuda T., Saito T., Yasukawa K., Kikutani H., Hirano T., Taga T., Kishimoto T. (1992): Abnormal distribution of IL-6 receptor in aged MRL/lpr mice: elevated expression on B cells and absence on CD4<sup>+</sup> cells. *Int. Immunol.* 4: 1407-1412

Koff A., Giordano A., Desai D., Yamashita K., Harper J.W., Elledge S., Nishimoto T., Morgan D.O., Franza B.R., Roberts J.M. (1992): Formation and activation of a cyclin E-CDK2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 157: 1689-1694

Kopf M., Baumann H., Freer G., Freudenberg M., Lamers M., Kishimoto T., Zinkernagel R., Bluethmann H., Köhler G. (1994): Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368: 339-342

Kopf M., Ramsay A.J., Brombacher F., Baumann H., Freer G., Galanos C., Gutierrez-Ramos J., Köhler G. (1995): Pleiotropic defects of IL-6-deficient mice including early hematopoiesis, T and B cell function and acute phase responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 752: 308-318

Kortylewski M., Heinrich P.C., Mackiewicz A., Schniertshauer U., Klingmüller U., Nakajima K., Hirano T. et al. (1999): Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. *Oncogene* 18: 3752-3753

Kovalovich K., DeAngelis R.A., Li W., Furth E.E., Ciliberto G., Taub R. (2000): Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. *Hepatology* 31(1):149-59.

Kovalovich K., Li W., DeAngelis R., Greenbaum L.E., Ciliberto G., Taub R. (2001): Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* 276(28): 26605-13

Kühn R., Schwenk F., Aguet M., Rajewsky K. (1995): Inducible gene targeting in mice. *Science* 269(5229): 1427-9

Kumanogoh A., Marukawa S., Kumanogoh T., Hirota H., Yoshida K., Lee I-S., Yasui T., Yoshida K., Taga T., Kishimoto T. (1997): Impairment of antigen-specific antibody production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of gp130. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2478-2482

Kushner I. (1982): The phenomenon of the acute phase response. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 389: 39-48

Lämmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

LaBaer J., Garrett M.D., Stevenson L.F., Slingerland J.M., Sandhu C., Chou H.S., et al. (1997): New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 11: 847-62

Ladel C.H., Blum C., Dreher A., Reifenberg K., Kopf M., Kaufmann S.H. (1997): Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infect. Immun.* 65: 4843-4849

Lai C-F., Ripperger J., Wang Y., Kim H., Hawley R.B., Baumann H. (1999): The STAT3-independent signaling pathway by glycoprotein 130 in hepatic cells. *J. Biol. Chem.* 274(12): 7793-7802

Lattanzio G., Libert C., Aquilina M., Cappelletti M., Ciliberto G., Musiani P., Poli V. (1997): Defective development of pristane-oil-induced plasmacytomas in interleukin-6-deficient BALB/C mice. *Am. J. Pathol.* 151: 689-696

Lauer N., Beck A.R., Cariou S., Richman L., Hofmann K., Reith W., Slingerland J.M., Amati B. (1998): Cyclin E2: a novel CDK2 partner in the late G1 and S phases of the mammalian cell cycle. *Oncogene* 19;17(20):2637-43.

Ledda-Columbano G.M., Pibiri M., Loi R., Perra A., Shinozuka H., Columbano A. (2000): Early increase in cyclin-D1 expression and accelerated entry of mouse hepatocytes into S phase after administration of the mitogen 1, 4-Bis[2-(3,5-Dichloropyridyloxy)] benzene. *Am. J. Pathol.* 156: 91-97

Lee M.H., Reynisdóttir I., Massagué J. (1995): Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.* 9: 639-49

Lees E., Faha B., Dulic V., Reed S.I., Harlow E. (1992): Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner. *Genes Dev.* 6(10):1874-85.

Loyer P., Glaise D., Cariou S., Baffet G., Meijer L., Guguen-Guillouzo C. (1994) : Expression and activation of cdks (1 and 2) and cyclins in the cell cycle progression during liver regeneration. *J Biol Chem.* 269(4):2491-500.

Li W., Liang X., Leu J.I., Kovalovich K., Ciliberto G., Taub R. (2001): Global changes in interleukin-6-dependent gene expression patterns in mouse livers after partial hepatectomy. *Hepatology* 33(6): 1377-86

Lütticken C., Wegenka U.M. Yuan J., Buschmann J., Schindler C., Ziemiecki A., Harpur A.G., Wilks A.F., Yasukawa K., Taga T., Kishimoto T., Barbieri G., Pellegrini S., Sendtner M., Heinrich P.C., Horn F. (1994): Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 263: 89-92

Maione D., DiCarlo E., Li W., Musiani P, Modesti A., Peters M., Rose-John S., Della Roxxa C., Tripodi M., Lazzaro D., Taub R., Savino R., Ciliberto G. (1998): Coexpression of IL-6 and soluble IL-6R causes nodular regenerative Hyperplasia and adenomas of the liver. *EMBO J.* 17(19): 5588-5597

Malaguarnera M., Di Fazio I., Romeo M.A., Restuccia S., Laurino A., Trovato B.A. (1997): Elevation of interleukin 6 levels in patients with chronic hepatitis due to hepatitis C virus. *J. Gastroenterol.* 32: 211-215

Maniatis T., Goodbourn S., Fischer J.A. (1987): Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 236: 1237-1244

Mars W.M., Kim T.H., Stolz D.B., Liu M.L., Michalopoulos G.K. (1996): Presence of urokinase in serum-free primary rat hepatocyte cultures and its role in activating hepatocyte growth factor. *Cancer Res.* 56(12):2837-43.

Matsuda T., Namura T., Nakao K., Arai T., Katsuki M., Heike T., Yokota T. (1999): STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.* 18(15): 4261-4269

McKinstry W., Metcalf D., Li C-L. (1994): Distribution of IL-6 receptors on murine hematopoietic and lymphoid cells and the anomalous action of IL-6 in stimulating granulocytic proliferation. *Leukemia* 8: 1726-1733

Mendel I., Katz A., Kozak N., Ben-Nun A., Revel M. (1998): Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: a study in gene-targeted mice. *Eur. J. Immunol.* 28:

Michalopoulos G.K., DeFrances M.C. (1997): Liver regeneration. *Science* 276 : 60-66

Mohn K.L., Laz T.M., Melby A.E., Taub R. (1990) : Immediate-early gene expression differs between regenerating liver, insulin-stimulated H-35 cells, and mitogen-stimulated Balb/c 3T3 cells. Liver-specific induction patterns of gene 33, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and the jun, fos, and egr families. *J Biol Chem.* 265(35):21914-21.

Morgan D.O. (1995): Principles of CDK regulation. *Nature* 374: 131-134

Mortensen R.F., Beisel K., Zeleznik N.J., Le P.T. (1983): Acute-phase reactants of mice. II. Strain dependence of serum amyloid P-component (SAP) levels and response to inflammation. *J. Immunol.* 130: 885-889

Mosley B., De Imus C., Friend D., Boiani N., Thoma B., Park L.S., Cosman D. (1996): Dual oncostatin M (OSM) receptors. *J. Biol. Chem.* 271: 32635-32643

Moskowitz N.H., Brown D.R., Reiner S.L. (1997): Efficient immunity against *Leishmania major* in the absence of interleukin-6. *Infect. Immun.* 65: 2448-2450

Matsuoka S., Edwards M.C., Bai C., Parker S., Zhang P., Baldini A. et al. (1995): p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* 9: 650-62

May L.T., Helfgott D.C., Sehgal P.B. (1986): Anti- $\beta$ -interferon antibodies inhibit the increase expression of HLA-B7 mRNA in tumor necrosis factor-treated human fibroblasts: Structural studies of the  $\beta_2$  interferon involved. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8957-8961

Munck-Petersen C., Davidsen O., Moestrup S., Sonne O., Nykjaer A. (1990): Cellular targets and receptors for interleukin-6, II. Characterization of IL-6 binding and receptors in peripheral blood cells and macrophages. *Eur. J. Clin. Invest.* 20: 377-384

Mullberg J., Schooltink H., Stoyan T., Gunther M., Graeve L., Buse G., Mackiewicz A., Heinrich P.C., Rose-John S. (1993): The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol.* 23(2):473-80.

Müllberg J., Durie F.H., Otten-Evans C., Alderson M.R., Rose-John S., Cosman D., Black R.A., Mohler K.M. (1995): A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor. *J. Immunol.* 155: 5198-5205

Murray A.W. (1992): Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* 359(6396):599-604. Review.

Nakayama K., Ishida N., Shiriane M., Inomata A., Inoue T., Shishido N. et al. (1996): Mice lacking p27<sup>Kip1</sup> display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasiy, and pituitary tumors. *Cell* 85: 707-20

Napoli J., Bishop G.A., McCaughan G.W. (1994): Increased intrahepatic messenger RNA expression of interleukin 2, 6, and 8 in human cirrhosis. *Gastroenterology* 107: 789-798

Nesbitt J.E., Fuller G.M. (1992): Dynamics of interleukin-6 internalization and degradation in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 267: 5739-5742

Niwa H., Burdon T., Chambers I., Smith A. (1998): Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Gen. Dev.* 12: 2048-60

Ohtsubo M., Roberts J.M. (1993): Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science.* 259(5103):1908-12.

Ohtsubo M., Theodoras A.M., Schumacher J., Roberts J.M., Pagano M. (1995): Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1 to S phase transition. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2612-2624

Pagano M.R., Pepperkok R., Verde F., Ansorge W., Draetta G. (1992): Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* 11: 961-971

Parker L.L., Atherton-Fessler S., Lee M.S., Ogg S., Falk J.L., Swenson K.I., Piwnicka-Worms H. (1991): Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34cdc2 in a wee1+ dependent manner. *EMBO J.* 10(5):1255-63.

Peters M., Jacobs S., Ehlers M., Vollmer P., Müllberg J., Wolf E., Brem G, et al. (1996): The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitisation of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6. *J. Exp. Med.* 183: 1399-1406

Peters M., Schirmacher P., Goldschmitt J., Odenthal M., Peschel C., Fattori E., Ciliberto G., Dienes H.P., Meyer zum Büschenfelde K.H., Rose-John S. (1997): Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in interleukin (IL)-6-sIL-6R double transgenic mice. *J. Exp. Med.* 185: 755-766

Poli V., Mancini F.P., Cortese R. (1990): IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. *Cell* 63: 643-653

Poli V., Balena R., Fattori E., Markatos A., Yamamoto M., Tanaka H., Ciliberto G., Rodan G.A., Costantini F. (1994): Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *EMBO J.* 13: 1189-1196

Poli V., (1997): IL-6 unique functions in inflammation, bone metabolism, and B-cell neoplasia revealed by studies on IL-6 deficient mice. In: *Contemporary Immunology: Cytokine Knockouts*. Ed.: Durum S.K., Muegge K., Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Polyak K., Kato J-Y., Solomon M.J., Sherr C.J., Massagué J., Roberts J.M. et al. (1994): p27<sup>Kip1</sup>, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 8: 9-22

Polyak K., Lee M.H., Erdjument-Bromage H., Koff A., Roberts J.M., Tempst P., et al. (1994): Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78: 59-66

Pomerantz J., Scheiber-Agus N., Liegeois N.J., Silverman A., Alland L., Chin L. et al. (1998): The INK4a tumor suppressor gene product p19<sup>Arf</sup> interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92: 713-23

Quelle D.E., Ashmun R.A., Shurtleff S.A., Kato J.Y., Bar-Sagi D., Roussel M.F., Sherr C.J. (1993): Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev.* 7(8):1559-71.

Quelle D.E., Zindy F., Ashmun R.A., Sherr C.J. (1995): Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83: 993-1000

Quelle D.E., Cheng M., Ashmun R.A., Sherr C.J. (1997): Cancer-associated mutations at the INK4a locus cancel cell cycle arrest by p16<sup>INK4a</sup> but not by the alternative reading frame protein p19<sup>ARF</sup>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 669-73

Ramsay A.J., Ruby J., Ramshaw I.A. (1993): A case for cytokines as effector molecules in the resolution of virus infection. *Immun. Today* 14: 155-157

Ramsay A.J., Husband A.J., Ramshaw I.A., Bao S., Matthaei K.I., Koehler G., Kopf M. (1994): The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science* 264(5158):561-3.

Ramsay A.J., Kopf M. (1997): IL-6 gene knockout mice. In: *Contemporary Immunology: Cytokine Knockouts*. Ed.; Durum, S.K. und Muegge K., Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Renisdóttir I., Massagué J. (1997): The subcellular locations of p15<sup>Ink4b</sup> and p27<sup>Kip1</sup> coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev.* 11:492-503

Resnitzky D., Gossen M., Bujard H., Reed S.I. (1994): Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol.* 14(3):1669-79.

Resnitzky D., Hengst L., Reed S.I. (1995): Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol Cell Biol.* 15(8):4347-52.

Resnitzky D., Reed S.I. (1995): Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol Cell Biol.* 15(7):3463-9.

Reynisdottir I., Polyak K., Iavarone A., Massagué J. (1995): Kip Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF- $\beta$ . *Genes Dev.* 9: 1831-45

Rincon M., Anguita J., Nakamura I., Fikrig E., Flavell R.A. (1997): IL-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 185: 461-469

Robledo O., Fourcin M., Chevalier S., Guillet C., Auguste P., Pouplard-Barthelaix A., Pennica D., Gascan H. (1997): Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component. *J. Biol. Chem.* 272: 4855-4863

Rodig S.J., Meraz M.A., White J.M., Lampe P.A., Riley J.K., Arthur C.D., King K.L., Sheehan K.C.F., Yin L., Pennica D., Johnson E.M. Jr., Schreiber R.D. (1998): Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 93: 373-383

Rodriguez C., Grosgeorge J., Nguyen V.C., Gaudray P., Theillet C. (1995): Human gp130 transducer chain gene (IL6ST) is localized to chromosome band 5q11 and

possesses a pseudogene on chromosome band 17p11. *Cytogenet. Cell. Genet.* 70: 64-67

Romani L., Mencacci A., Cenci E., Spaccapelo R., Toniatti C., Pucetti P., Bistoni F., Poli V. (1996): Impaired neutrophil response and CD4<sup>+</sup> T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with candida albicans. *J. Exp. Med.* 183: 1345-1355

Romano M., Sironi M., Toniatti C., Polentarutti M., Fruscella P., Ghezzi P., Faggioni R., Luini W., VanHinsbergh V., Sozzani S., Bussolino F., Poli V., Ciliberto G., Matntovani A. (1997): Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 6: 315-325

Rose T.M., Bruce A.G. (1991): Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitor factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8641-8645

Runge D., Runge D.M., Drenning S.D., Bowen W.C. Jr., Grandis J.R., Michalopoulos G.K. (1998): Growth and differentiation of rat hepatocytes: Changes in transcription factors HNF-3, HNF-4, STAT-3, and STAT-5. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 250: 762-768

Saito M., Yoshida K., Hibi M., Taga T., Kishimoto T. (1992): Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *J. Immunol.* 148: 4066-4071

Sakamoto T., Liu Z., Murase N., Ezure T., Yokomuro S., Poli V., Demetris A.J. (1999): Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin 6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* 29: 403-411

Schirmacher P., Peters M., Ciliberto G., Blessing M., Lotz J., Meyer zum Büschenfelde K.H., Rose-John S. (1998): Hepatocellular hyperplasia, plasmacytoma formation and extramedullary hematopoiesis in interleukin (IL)-6/soluble IL-6 receptor double-transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 153(2): 639-644

Schumann G., Huell M., Machein U., Hocke G., Fiebich B.L. (1999): Interleukin-6 activates signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways and induces de novo protein synthesis in human neuronal cells. *J. Neurochem.* 73: 2009-2017

Sehgal P.B., Grienger G., Tosato G. (1989): Regulation of the acute phase and immune responses: interleukin-6. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 557: 1-583

Selzner M., Camargo C.A., Clavien P.A. (1999): Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: protective effects of interleukin-6. *Hepatology* 30(2): 469-75

Shen M.M., Skoda R.C., Cardiff R.D., Campos-Torres J., Leder P., Ornitz D.M. (1994): Expression of LIF in transgenic mice results in altered thymic epithelium and apparent interconversion of thymic and lymph node morphologies. *EMBO J.* 13: 1375-1385

Sherr C.J. (1994): Mammalian G<sub>1</sub> cyclins. *Cell* 73: 1059-1065

Sherr C.J. (1994): G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79: 563-571

Singh H., Sen R., Baltimore D., Sharp P.A. (1986): A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature* 319: 154-158

Soos T.J., Kiyokawa H., Yan J.S., Rubin M.S., Giordano A., DeBlasio A. et al. (1996): Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle. *Cell Growth Differ.* 7: 135-46

Stahl N., Boulton T.G., Farruggella T., Ip N.Y., Davis S., Witthuhn B.A., Quelle F.W., Silvenoinen O., Barbieri G., Pellegrini S., Ihle J.N., Yanocopoulos G.D. (1994): Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 $\beta$  receptor components. *Science* 263: 92-95

Stahl N., Farruggella T.J., Boulton T.G., Zhong Z., Darnell J.E. Jr., Yanocopoulos G.D. (1995): Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267: 1349-1353

Starr R., Willson T.A., Viney E.M., Murray L.J.L., Rayner J.R., Jenkins B.J., Gonda T.J., Alexander W.S., Metcalf D., Nicola N.A., Hilton D.J. (1997): A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. *Nature* 387: 917-921

Stott F.J., Bates S., James M.C., McConnell B.B., Starborg M., Brookes S., et al. (1998): The alternative product from the human *CDKN2A* locus, p14<sup>ARF</sup>, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.* 17: 5001-14

Streetz K.L., Luedde T., Manns M.P., Trautwein C. (2000): Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut* 47(2): 309-12

Suematsu S., Matsuda T., Aozasa K., Akira S., Nakano N., Ohne S., Miyazaki J., Yamamura K., Hirano T., Kishimoto T. (1989): IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7547-7551

Suzuki Y., Rani S., Liesenfeld O., Kojima T., Lim S., Nguyen T.A., Dalrymple S.A., Murray R., Remington J.S. (1997): Impaired resistance to the development of toxoplasmic encephalitis in interleukin-6-deficient mice. *Infect. Immun.* 65: 2339-2345

Taga T., Kawanishi Y., Hardy R.R., Hirano T., Kishimoto T. (1987): Receptors for B cell stimulatory factor 2. *J. Exp. Med.* 166: 967-981

Taga T., Kishimoto T. (1997): Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 797-819

Taga T. (1997): The signal transducer gp130 is shared by interleukin-6 family of haematopoietic and neurotrophic cytokines. *Ann. Med.* 29: 63-72

Tajima S., Tsuji K., Ebihara Y., Sui X., Tanaka R., Muraoka K., Yoshida M., Yamada K., Yasukawa K., Taga T., Kishimoto T., Nakahata T. (1996): Analysis of interleukin-6 receptor and gp130 expression and proliferative capability of human CD34<sup>+</sup> cells. *J. Exp. Med.* 184: 1357-1364

Talarmin H., Rescan C., Cariou S., Glaise D., Zanninelli G., Bilodeau M., Loyer P., Guguen-Guillouzo C., Baffet G. (1999): The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G<sub>1</sub> phase progression in proliferating hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* 19(9): 6003-6011

Taub R. (1996): Liver regeneration in health and disease. *Clin Lab Med.* 16(2):341-60. Review.

Teranishi T., Hirano T., Arima N., Onoue K. (1982): Human helper T cell factor(s) (ThF). II. Induction of IgG production in B lymphoblastoid cell lines and identification of T cell repalcing factor (TRF)-like factor(s). *J. Immunol.* 128: 1903-1908

Thiel S., Behrmann I., Dittrich E., Muys L., Tavernier J., Wijdenes., Heinrich P.C., Graeve L. (1998): Internalization of the interleukin 6 signal transducer gp130 does not require activation of the Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 330: 47-54

Trautwein C., Böker K., Manns M.P. (1994): Hepatocyte and immune system: acute phase reaction as a contribution to early defense mechanisms. *Gut* 35: 1163-1166

Trautwein C., Rakemann T., Niehof M., Rose-John S., Manns M.P. (1996): Acute-phase response factor, increased binding and target gene transcription during liver regeneration. *Gastroenterology* 114: 1035-1045

Trautwein C., Rakemann T., Pietrangelo A., Plümpe J., Montosi G, Manns M.P. (1996): C/EBP-b/LAP controls downregulation of albumin gene expression during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 271: 22262-22270

Trautwein C., Rakemann T., Malek N.P., Plümpe J., Tiegs G., Manns M.P. (1998): Concanavalin A-induced liver injury triggers hepatocyte proliferation. *J. Clin. Invest.* 101(9): 1960-1969

Trautwein C., Will M., Kubicka S., Rakemann T., Flemming P., Manns M.P. (1999): 2-Acetaminofluorene blocks cell cycle progression after hepatectomy by p21 induction and lack of cyclin E expression. *Oncogene* 18: 6443-6453

Toyoshima H., Hunter T. (1994): p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78: 67-74

Van Dam M., Müllberg J., Schootlink H., Stoyan T., Brakenkoff J., Heinrich P.C., Rose-John S. (1993): Structure-function analysis of interleukin-6 utilizing human/murine chimeric molecules: involvement of two seperate domains in receptor binding. *J. Biol. Chem.* 268: 15285-15290

Van Snick J. (1990): Interleukin-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 253-278

Voller A., Bidwell D., Bartwell A. (1980): Enzyme-linked immunosorbent assay. In Rose, N.R., Friedman H., eds., *Manual of Clinical Immunology*, 2<sup>nd</sup> ed., American Society of Microbiology, Washington D.C.

Walker P.R., Potter V.R. (1972): Isozyme studies on adult, regenerating, precancerous and developing liver in relation to findings in hepatomas. *Adv Enzyme Regul.* 10:339-64. Review.

Wang X-J., Taga T., Yoshida K., Saito M., Kishimoto T., Kikutani H. (1998): gp130, the cytokine common signal-transducer of interleukin-6 cytokine family, is downregulated in T cells in vivo by interleukin-6. *Blood* 91: 3308-3314

Ware C.B., Horowitz M.C., Renshaw B.R., Hunt J.S., Liggitt D., Koblar S.A., Gliniak B.C., McKenna H.J., Papayannopoulou T., Thoma B., Cheng L., Donovan P.J., Peschon J.J., Bartlett P.F., Willis C.R., Writht B.D., Carpenter M.K., Davison B.L., Gearing D.P. (1995): Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development* 121: 1283-1299

Weinberg R.A. (1995): The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Ann N Y Acad Sci.* 758:331-8. Review.

Weinberg R.A. (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81(3):323-30. Review. No abstract available.

Wen Z., Zhong Z., Darnell J.E. Jr. (1995): Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82: 241-250

Wognum A.W., VanGils F.C.J.M., Wagemaker G. (1993): Flow cytometric detection of receptors for interleukin-6 on bone marrow and peripheral blood cells of humans and rhesus monkeys. *Blood* 81: 2036-2043

Woodroffe C., Müller W., Rütger U. (1992): Long-term consequences of interleukin-6 overexpression in transgenic mice. *DNA Cell. Biol.* 11: 587-592

Xu H.S., Rosenlof L.K., Jones R.S. (1993): Bile secretion and liver regeneration in partially hepatectomized rats. *Ann Surg.* 218(2):176-86.

Yan Y., Frisén J., Lee M-H., Massagué J., Barbacid M. (1997): Ablation of the CDK inhibitor p57<sup>Kip2</sup> results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes Dev.* 11: 973-83

Yamada Y., Kirillova I., Peschon J.J., Fausto N. (1997): Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1441-1446

Yamanaka Y., Nakajima K., Fukada T., Hibi M., Hirano T. (1996): Differentiation and growth arrest signals are generated through the cytoplasmic region of gp130 that is essential for Stat3 activation. *EMBO J.* 15(7): 1557-1565

Yamasaki K., Taga T., Hirata Y., Yawata H., Kawanishi Y., Seed B., Taniguchi T., Hirano T., Kishimoto T. (1988): Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN $\beta$ 2) receptor. *Science* 241: 825-828

Yee A.G., Revel J.P. (1975): Endothelial cell junctions. *J Cell Biol.* 1975 66(1):200-4.

Yoshida K., Taga T., Saito M., Suematsu S., Kumanogoh A., Tanaka T., Fujiwara H., Hirata M., Yamagami T., Nakahata T., Hirabayashi T., Yoneda Y., Tanaka Y., Wang W-Z., Mori C., Shiota K., Yoshida N., Kishimoto T. (1996): Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 407-411

Yoshida K., Taga T., Sato M., Kumanogoh A., Tanaka T., Ozono K., Nakayama M., Nakahata T., Yoshida N., Kishimoto T. (1997): Myocardial, hematological, and placenta disorders caused by targeted disruption of gp130, a common signal transducer for IL-6 family of cytokines. In: *Contemporary Immunology: Cytokine Knockouts*. Ed.: Durum S.K., Muegge K., Humana Press Inc., Totowa, NJ:

Zariwala M., Liu J., Xiong Y. (1998): Cyclin E2, a novel human G1 cyclin and activating partner of CDK2 and CDK3, is induced by viral oncoproteins. *Oncogene*. 26;17(21):2787-98.

Zhang P., Liegeois N.J., Wong C., Finegold M., Hou H., Thompson J.C. et al. (1997): Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 387: 151-8

Zhang Y., Xiong Y., Yarbrough W.G. (1998): ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 92: 725-34

Zhang H., Hannon G.J., Beach D. (1994): p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev.* 8: 1750-8

Zilberstein A., Ruggieri R., Korn J.H., Revel M. (1986): Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J.* 5: 2529-2537

Zohlhöfer D., Graeve L., Rose-John S., Schooltink H., Dittrich E., Heinrich P.C. (1992): The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand. *FEBS Lett.* 306: 219-222

Zola H., Flego L. (1992): Expression of interleukin-6 receptor on blood lymphocytes without in vitro activation. *Immunology* 76: 338-340

## 7 Veröffentlichungen

### Originalarbeiten:

Tietze M.K., Wuestefeld T., Paul Y., Zender L., Trautwein C., Manns M.P., Kubicka S. (2000): I kappa B alpha gene therapy in tumor necrosis factor-alpha- and chemotherapy-mediated apoptosis of hepatocellular carcinomas. *Cancer Gene Ther.* 7(10): 1315-1323

Wustefeld T., Rakemann T., Kubicka S., Manns M.P., Trautwein C. (2000): Hyperstimulation with interleukin 6 inhibits cell cycle progression after hepatectomy in mice. *Hepatology* 32(3): 514-522

Milicevic N.M., Luettig B., Trautwein C., Wustefeld T., Mahler M., Jecker P., Wonigeit K., Westermann J. (2001): Splenectomy of rats selectively reduces lymphocyte function-associated antigen 1 and intercellular adhesion molecule 1 expression on B-cell subsets in blood and lymph nodes. *Blood* 98(10): 3035-3041

Wustefeld T., Klein C., Streetz K.L., Betz U., Buer J., Manns M.P., Müller W., Trautwein C. (2002): IL6/gp130-dependent pathways are protective during liver regeneration. Submitted

Steiling H., Wustefeld T., Kümin A., Brauchle M., Fässler R., Born-Berclaz C., Teupser D., Schaper F., Thiery J., Gordon J.I., Trautwein C., Werner S. (2002): Fibroblast growth factor receptor signaling is crucial for liver homeostasis and regeneration. Submitted

Streetz K.L., Wüstefeld T., Leitfeld L., Tacke F., Tronche F., Graw A., Kamino K., Betz U., Sprengler U., Kreipe H., Schütz G., Manns M.P., Müller W., Trautwein C. (2002): Lack of gp130 expression promotes hepatic injury. Submitted

### Übersichtsartikel:

Streetz K.L., Wüstefeld T., Klein C., Manns M.P., Trautwein C. (2002): IL6 dependent signal transduction and its relevance in animal models. *Cytokines in Liver and Repair*, Falk Symposium 125; Gressner et al. (eds)

Streetz K.L., Wüstefeld T., Klein C., Manns M.P., Trautwein C. (2001): Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. *Cell. Mol. Biol.* 47(4): 661-673

Luedde T., Wustefeld T., Trautwein C. (2001): A new player in the team: SOCS-3 socks it to cytokine signaling in the regenerating liver. *Hepatology* Hepatology Elsewhere

**Abstracts:**

Wuestefeld T., Rakemann T., Kubicka S.H., Rose-John S., Manns M.P., Trautwein C. (1999): Prolonged STAT3 activation leads to delayed cell proliferation after partial hepatectomy. *Hepatology* 30(4): 973 Part 2 Suppl. S, AASLD Dallas

Tietze M.K., Kubicka S., Trautwein C., Wuestefeld T., Plumpe J., Manns M.P. (1999): I $\kappa$ B-gene therapy does not enhance chemotherapy-induced apoptosis in HCC. *Eur. J. Cancer* 35: 1437 Suppl. 4, ECO Wien

Wustefeld T., Rakemann T., Kubicka S., Manns M.P., Trautwein C. (2000): Prolonged STAT3 activation inhibits hepatocyte proliferation after hepatectomy. *J. Hepatol.* 32: 161 Suppl. 2, EASL Rotterdam

Wuestefeld T., Graw A., Betz U., Manns M.P., Mueller W., Trautwein C. (2000): Inducible gp130 deletion in the liver blocks STAT3 activation and has no effect on DNA synthesis after hepatectomy. *Hepatology* 32(4): 666 Part 2, AASLD Dallas

Streetz K.L., Wuestefeld T., Kreipe H., Tronche F., Schuetz G., Betz U., Mueller W., Manns M.P., Trautwein C. (2001): The role of gp130 in the liver – Differentiation between hepatocytes and non-parenchymal liver cells in CCL4 induced liver injury. *J. Hepatol.* 34: 7- Suppl. 1, EASL Prag

Wuestefeld T., Streetz K.L., Betz U., Mueller W., Manns M.P., Trautwein C. (2000): After partial hepatectomy gp130 is involved in the priming phase of hepatocytes, but not essential for liver regeneration. *J. Hepatol.* 34: 83 Suppl. 1, EASL Prag

Wuestefeld T., Klein C., Streetz K.L., Betz U., Mueller W., Manns M.P., Trautwein C. (2001): Gp130-dependent pathways are essential in regulating the priming phase and acute phase response after partial hepatectomy. *Hepatology* 34 (4): 858 Part 2 Suppl. S, AASLD Dallas

Streetz K.L., Wuestefeld T., Graw A., Kamino K., Tronche F., Betz U., Mueller W., Manns M.P., Trautwein C. (2001): The role of gp130 during acute-phase-reaction and liver injury. *Hepatology* 34(4): 424 Part 2 Suppl. S, AASLD Dallas

Wuestefeld T., Steiling H., Kubicka S., Gordon J.I., Manns M.P., Werner S., Trautwein C. (2001): Activation of the keratinocyte growth factor receptor is important to control cell cycle progression after partial hepatectomy. *Hepatology* 34(4): 275 Part 2 Suppl. S AASLD Dallas Vortrag

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammonium Persulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Celsius
ca.	circa
Ci	Curie
cpm	counts per minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N.N.N'.N'-tetraacetat
et al.	und andere
etc.	et cetera
Fa.	Firma
g	Gramm
h	Stunden
HAP	Haptoglobin
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
hIL-6	humanes IL-6
Ig	Imunglobulin
IL	Interelukin
IL-6	Interleukin-6
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
kBq	Kilobequerel

kD	Kilodalton
konz.	konzentriert(e)
l	Liter
LB	Luria Broth
Leu	Leupeptin
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
m	mili
μ	mikro
M	Mol
min.	Minute(n)
ml	Mililiter
mM	Milimol
MOPS	3-[N-Morpholino]-2-hydroxypropanesulfonic acid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Molecular-weight-marker (Molekulargewicht)
n	nano
NF	Nuclear factor
NK	Negativkontrolle
OD	Optische Dichte
OP	Operation
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PEP A	Pepstatin A
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
PH	partielle Hepatektomie = 2/3-Hepatektomie
PMSF	Phenylmethylsulfonic Fluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
spez.	spezifisch
SSC	Saline-sodium-citrate-buffer
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borate-EDTA-buffer

TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-buffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TLCK	N-Tosyl-L-Lysine Chloromethyl Ketone
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanine Chloromethyl Ketone
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
u.a.	und andere
UV	ultraviolett
vol.	volume
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen bei Prozentangaben
Y	Phospho-Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

## **9 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere eidesstattlich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet habe.

Benutzte Hilfsmittel sowie die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen sind vollständig angegeben.

Hannover, im März 2002

## 10 Danksagung

Wesentlichen Anteil am Erfolg dieser Arbeit hatten die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie. Hierfür möchte ich Herrn Prof. Dr. med. M.P. Manns danken.

Herrn Prof. Dr. med. Christian Trautwein danke ich für die Überlassung des Themas, für seine wissenschaftliche Anleitung und sein stete Diskussionsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Christian Liedtke möchte ich für seine konstruktiven Tipps bei der Anfertigung dieser Arbeit und für das kritische Lesen des Manuskripts danken.

Auch herzlich danken möchte ich meinen Kollegen für das gute Arbeitsklima in der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, wobei ich namentlich Christian Klein, Nils-Holger Zschemisch, Frank Tacke, Konrad Streetz, Florian Kühnel und Lars Zender nennen möchte.

Herzlichster Dank gilt auch meinen Eltern für ihre immer währende Unterstützung.

## Lebenslauf

Name: Torsten Wüstefeld

Geburtsdatum: 02.Juni 1973

Geburtsort: Göttingen

Wohnung: Joh.-Kepler-Str. 5a, 30974 Wennigsen

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1979 – 1983  
Grundschule in Langenhagen

1983 – 1985  
Orientierungsstufe in Wennigsen

1985 – 1992  
Mathias-Claudius-Gymnasium in Gehrden  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium: 1992 – 1998  
Studium der Biologie, Universität Hannover

1994  
Diplomvorprüfung in Botanik, Zoologie, Chemie und Physik

1995 – 1996  
Studium der Biologie, Northeastern University, Boston  
Stipendium des DAAD

1997 – 1998  
Molekularbiologische Untersuchungen für die Diplomarbeit

Thema: Arbeiten zur Molekularbiologischen  
Charakterisierung des 'fasciata'-Syndroms der  
Erbse

Labor: Lehrgebiet Molekulargenetik an der Universität  
Hannover bei Prof. Dr. rer. nat. H.-J. Jacobsen

Abschluß: Diplom-Biologe  
1998  
Diplomprüfung in Genetik, Mikrobiologie, Biochemie und  
Immunologie

Wissenschaftliche  
Tätigkeit:

1998 – 2002

Untersuchungen molekularbiologischer  
Regulationsmechanismen im Rahmen der Leberregeneration für  
die Anfertigung einer Dissertation

Labor: Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und  
Endokrinologie an der Medizinischen Hochschule  
Hannover bei Prof. Dr. med. Ch. Trautwein

Rigorosum: 07. Mai 2002

Wennigsen, 07.07.2002