Abteilung Innere Medizin II
Kardiologie, Angiologie, Nephrologie und Pneumologie
der Universität Ulm
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. V. Hombach

Untersuchungen zur Rolle des Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 3 bei der transkriptionellen Regulation der Synthese des C-reaktiven Proteins

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Henrik Fox
aus Frechen

2006

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jan Torzewski

2. Berichterstatter: Priv. -Doz. Dr. Jochen Greiner

Tag der Promotion: 19.04.2007

Die Naturwissenschaft braucht der Mensch zum Erkennen,
die Religion zum Handeln,
weil wir mit unseren Willensentscheidungen nicht warten können,
bis die Erkenntnisse vollständig, und bis wir allwissend geworden sind.

Max Planck (1858-1947), dt. Physiker (Quantentheorie), 1918 Nobelpreis

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Begriffsdefinition der Atherosklerose 1
1.2 Atherogenese 1
1.3 Das C-reaktive Protein (CRP) 4
1.3.1 Geschichtlicher Hintergrund des CRP 4
1.3.2 Aufbau des CRP 5
1.3.3 Physiologie und Phylogenese des CRP 6
1.4 CRP und Atherogenese 7
1.4.1 CRP und kardiovaskuläre Erkrankungen 8
1.4.2 CRP und das Immunsystem 9
1.4.3 CRP Anstiege im Serum 12
1.4.4 CRP und Pharmaka 14
1.4.5 CRP und Lipide 17

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien, Zellen, Zellkulutur und Bakterienstämme 18
2.2 Geräte 19
2.3 Laborverbrauchsmaterialen 20
2.4 PCR 25
2.5 Western Blot 29
2.6 Transfektionen 32
2.7 Luciferase Assay 40
2.8 α- Tubulin Ladekontrolle 42

3. Ergebnisse

3.1 Hintergründe …… 43
3.2 Transiente Transfektionen ……..45
3.3 Stabile Transfektion ……54

4. Diskussion

4.1 Ergebnisse der Arbeit ……..65
4.2 CRP als Targetmolekül zur Prävention der Atherosklerose ……. 70
4.3 Möglichkeiten zur Reduktion von CRP Serumwerten ……. 73
4.4 neue Signalwege: Proteinkinase C Pathway und CRP Expression 77
4.5 CRP Rezeptor …….. 80

5. Zusammenfassung ……. 85

6. Literaturverzeichnis ……..…….. 87

7. Danksagung ……97

8. Curriculum vitae ……..…… 98

Abkürzungsverzeichnis

°F	Grad Fahrenheit
ABEK	HepG2 Zellkulturmodell, enthält eine stabile Transfektion eines 1kb CRP Promotorkonstrukts und des Luciferase Reportergens
AGP	Acid Glykoprotein
aHT	Arterielle Hypertonie
AK	Antikörper
AMPK	AMP-aktivierte Kinase
AP	Angina Pectoris
APR	Acute Phase Response
APRE	Akute Phase Response Element
AS	Aminosäure
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-Dicarbonsäure
BMI	Body Mass Index
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
C/EBP	CCAAT/ enhancer-binding protein
C/EBP beta	CCAAT/ enhancer-binding protein beta
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CCLR	Cell Culture Lysis Reagent
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
Cl^-	Chlorid
CO_2	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
CRP	C-reaktives Protein
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleotid Triphosphat
ECL	Elektrochemolumineszenz

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
eNOS	Endotheliale Nitrit Oxidsynthase
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal Calve Serum
GAPDH	Glyseraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GvHD	Graft versus Host disease
H_2O	Wasser
Hep 3B	Hepatoma 3B
Hep G2	Hepatoma G2
HLP	Hyperlipoproteinämie
HMG	Hydroxy Methylglutaryl
HNF	Hepatocyte Nuclear Factor
HTS	High-Throughput-Screening
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL -1Ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
JAK	Janus Kinase
K^+	Kaliumion
kD	Kilo Dalton
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipid Lateral Phase Separation
LPS	Lipopolysaccharid
Luc	Luciferase
M	Molar
Mg	Magnesium
mM	millimolar
MONICA	Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease/Cooperative Health Research in the Region of Augsburg
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natriumhydroxid
NFIL	Nuclear Factor Interleukin
NF-kappaB	Nuclear Factor of KappaB
NO	Nitroxid
NT	Not treated, unbehandelt
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDBu	4α-Phorbol-12,13-Dibutyrat
pH	Potentia Hydrogenii, gebildet als negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHH	Primäre humane Hepatozyten
PKC	Proteinkinase C
PSG	Penicillin/Streptomycin/L-Glutamine
RMS	Root Mean Square, mittlerer Fehler
RNA	Ribonucleic Acid
RT PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SAA	Serum Amyloid A
SAP	Serum Amyloid P
SDS	Sodium Dodecyl- oder auch Laurylsulfat
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STAT	Signal Transducer and Acitvator of Transcription
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TNF	Tumor Nekrose Faktor
USA	United States of America
UV	Ultraviolett
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WHO	Word Health Organisation
w/v	Weight by volume, beschreibt die Konzentration einer Substanz in einer Lösung oder Mixtur

1. Einleitung

1.1 Begriffsdefinition der Atherosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die am häufigsten zum Tode führenden Krankheiten in den USA, Europa und Japan. Hauptfaktor dabei ist die Atherosklerose, die über eine regionale Minderperfusion zur arteriellen Verschlusskrankheit und schließlich zu Herzinfarkten, Schlaganfällen, sowie zu Gangrän von Extremitäten führen kann. Dabei tritt ein Funktionsverlust des Gewebes und der Organe auf, welcher neurologische Defizite oder funktionelle Einschränkungen des Organismus mit sich bringen kann (World Health Organization: Classification of atherosclerotic lesions 1985). Die Erkrankung der Atherosklerose beginnt dabei bereits in frühester Jugend und schreitet unaufhaltsam mit unterschiedlicher Geschwindigkeit bei allen Individuen, im Laufe des Lebens fort. Per WHO Definition besteht die Atherosklerose aus einer variablen Kombination von Intimaveränderungen, aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia (Riede et al. 1995). Im deutschen Sprachgebrauch werden die Begriffe Atherosklerose und Arteriosklerose synonym verwendet.

1.2 Atherogenese

Schon seit Mitte des 19. Jahrhunderts wurden zahlreiche Hypothesen zur Pathogenese der Atherosklerose diskutiert. Da die Atherosklerose ein multifaktorielles Geschehen darstellt, konnten die in der Vergangenheit aufgestellten Hypothesen bisher nur Teilaspekte dieser Erkrankung beleuchten. Die Annahme, dass eine Störung des komplexen Zusammenspiels zwischen Gefäßwand, Entzündungszellen und Gerinnungssystem zu einer primären Inkorporation parietaler Mikrothromben in die Gefäßwand führt, ist schon sehr alt (Rokitansky 1852). Virchow vermutete bereits 1856, dass eine Schädigung des Endothels in der Arterienintima die Atherogenese initiiert (Virchow 1856). Später

modifiziert von French (French et al. 1966), entwickelte Ross die „Response – to – injury“ Hypothese. Darunter wird als Schlüsselereignis der Atherogenese eine Störung der funktionellen Integrität des Gefäßendothels („endotheliale Dysfunktion“) verstanden. Veränderungen der physiologischen Eigenschaften werden durch biologisch aktive Substanzen ausgelöst, die mit dem Auftreten von Risikofaktoren wie Zigarettenrauchen, Diabetes mellitus, Arterielle Hypertonie und Hyperlipidämie vergesellschaftet sind (Ross et al. 1973, Ross 1999). Die endotheliale Dysfunktion steigert die Adhäsionseigenschaften des Endothels für Leukozyten und Thrombozyten, und weiterhin auch die Permeabilität für zahlreiche Plasmakomponenten, wie das CRP. Zudem induziert die Verletzung des Endothels eine prokoagulatorische Wirkung. Es resultiert eine inflammatorische Reaktion des Gewebes und die chronische Entzündung bewirkt eine Dilatation der Arterienwand, wobei das Lumen anfangs noch unverändert bestehen kann. Dieser Vorgang des Umbaus wird auch als „remodeling“ bezeichnet (Glagov et al. 1987).

Atherosklerotische Läsionen können nach ihrer Morphologie in verschiedene Stadien eingeteilt werden. Das Spektrum dieser Gefäßwandveränderungen reicht von sehr frühen subendothelialen Akkumulationen von Monozyten bis zu den fortgeschrittenen Läsionen, die im Gegensatz zu den Frühveränderungen klinische Relevanz zeigen und zu einer Gefäßstenose oder zu einer Plaqueruptur führen können (Fuster et al. 1996). Dieser Umstand kann dann Folgen von Minderperfusionen der nachfolgenden Organareale mit sich bringen und diese Bereiche nachhaltig schädigen. Die gesunde Arterienwand besteht grundsätzlich aus 3 Schichten, aus der Tunica intima, der Tunica media und der Tunica externa oder auch adventitia genannt. Für die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen ist vor allem die Tunica intima von Bedeutung. Die Intima besteht aus zwei anatomischen Schichten, die sich durch ihren Aufbau voneinander unterscheiden. Die dem Gefäßlumen zugewandte Lamina fibroelastica, eine Proteoglykanschicht, setzt sich in erster Linie aus Bindegewebe zusammen und enthält einzelne Muskelzellen. Die in der Lamina fibroelastica lokalisierten Muskelzellen besitzen sekretorische oder kontraktile Eigenschaften. In der bis zur Media reichenden Lamina fibromuscularis finden sich Schichten aneinandergereihter Muskelzellen vom sekretorischen Phänotyp (Rieger et al. 1998). Die Intima menschlicher Arterien kann physiologisch eine unterschiedliche Dicke aufweisen. Regionen, in

denen die Intima relativ zu den anderen Gefäßwandschichten dick erscheint, bestehen bereits in frühester Kindheit, meist schon ab der ersten Lebenswoche und behindern den Blutfluss nicht (Stary et al. 1992). Diese Regionen repräsentieren physiologische Anpassungen der Gefäßwand an spezielle mechanische, hämodynamische Kräfte und werden deshalb adaptive Intimaverdickungen, oder im Englischen auch „adaptive initmal thickenings“ genannt. Sogenannte „exzentrische“ adaptive Intimaverdickungen sind fokale, streng umschriebene Veränderungen, die an Gefäßabgängen und -verzweigungen vorkommen. Im Gegensatz dazu spricht man von einer „diffusen“ adaptiven Intimaverdickung, wenn die Adaptation nicht auf bestimmte Gefäßregionen limitiert ist. Da die adaptiven Intimaverdickungen zu einer vermehrten Lipid -Akkumulation neigen und eine erhöhte Umsatzrate der Endothel- und Muskelzellen aufweisen, werden diese Regionen als Prädilektionsstellen der Atherosklerose angesehen (Stary et al. 1994). Allerdings führt das alleinige Auftreten dieser morphologischen und funktionellen Veränderungen noch nicht zum Vollbild einer Gefäßstenose.

Die Hinweise, dass die humorale Immunabwehr eine maßgebliche Rolle in der Entstehung und Progression der Atherosklerose spielt, verdichten sich immer mehr. Die prädiktive Bedeutung insbesondere des Akute Phase Proteins, C-reaktives Protein (CRP), sowie anderer inflammatorischer Marker für koronare Ereignisse und die Gesamtmortalität wurde in großen klinisch -epidemiologischen Studien untersucht und belegt (MONICA Augsburg Projekt, Koenig et al. 1994, Koenig et al. 1998, Koenig et al. 1999, Koenig et al. 2000). Bereits in frühen Stadien der Atherogenese erfolgt eine Aktivierung des Komplementsystems. Der Nachweis der Aktivierung des Komplementsystems durch CRP ist bisher nur für menschliches CRP in isologen Seren gelungen, bislang nicht jedoch im Tierversuch. Eine Übertragung von Ergebnissen aus Tierversuchen ist als äußerst schwierig einzustufen. Bei diesen Arbeiten wurde das CRP als eine komplementaktivierende Substanz identifiziert, dessen Deposition von terminalen Komplementkomplexen in der Lamina fibromuscularis der Gefäßwandintima als Zeichen einer chronischen Komplementaktivierung in den frühesten Krankheitsstadien auftritt (Torzewski M et al. 1997, Torzewski M et al. 1998, Torzewski J et al. 1998). Wenn CRP an makromolekulare Strukturen gebunden wird, so wird das humane CRP vom Komplementsystem über den Komplementfaktor C1q erkannt, was eine starke Aktivierung des klassischen

Weges der Komplementkaskade zur Folge hat (Volanakis 1982). Dabei tritt auch der Komplementfaktor C3 in den Mittelpunkt, welcher das hauptsächliche Adhäsionsmolekül des Komplementsystems darstellt. Es folgen die terminalen membranangreifenden Faktoren C5 -C9. Gebundenes CRP stellt darüber hinaus Bindungsstellen für den Faktor H zur Verfügung, was die Regulation des alternativen Weges der Komplementkaskade ermöglicht und eine Verstärkung der C5 -Konvertase zulässt (Mold et al. 1999).

1.3 Das C-reaktive Protein

1.3.1 Geschichtlicher Hintergrund des CRP

Das akute Phase Protein C-reaktives Protein (CRP), benannt nach seiner Eigenschaft somatische C -Polysaccharide von Streptococcus pneumoniae binden zu können, ist das zuerst beschriebene Akute Phase Protein und hat die Eigenschaft ein äußerst sensitiver Marker für eine systemische Entzündung, Infektion oder einen Gewebeschaden, sowie für maligne Neoplasien zu sein (Pepys et al. 1983). CRP ist ein Pentraxin, d.h. es besteht aus fünf identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils 21 kD. Die CRP Konzentration ist ein sehr nützlicher biochemischer Marker als Hinweis auf organische Krankheiten und als Verlaufskontrolle für den Behandlungserfolg von entzündlichen und infektiösen Erkrankungen, sowie als Hinweis auf einen sich entwickelnden entzündlichen Prozess bei immunkompromittierten Patienten, deren Immunsystem nicht mit gleicher Deutlichkeit und Schnelligkeit auf derartige pathologische Prozesse, im Vergleich zum Gesunden, reagiert. Aber auch beim Gesunden gibt es vereinzelt Erkrankungen auf welche lediglich ein erhöhter CRP Wert hinweist und die durch kaum merkliche, bis keine Akute Phase Antwort charakterisiert sind (Pepys et al. 1983). Beispiele hierfür sind der Systemische Lupus Erythematodes (SLE), sowie die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie der Morbus Chron oder die Colitis Ulcerosa. Der genaue Hintergrund für diese Art der alleinigen Reaktion des CRP ist bis heute nicht geklärt. Möglicherweise haben Pentraxine, zu deren Gruppe das CRP gehört, eine Funktion zur Verhütung von autoimmunologischen Prozessen. Ein erniedrigter

CRP Wert könnte nach dieser Theorie Autoimmunerkrankungen ermöglichen und möglicherweise sogar fördern (Pepys et al. 1983).

1.3.2 Aufbau des CRP

Das menschliche CRP Molekül besteht aus fünf identischen, nicht glykosylierten Untereinheiten, die aus je 206 Aminosäuren bestehen. Die Promotoren stehen dabei in einer nicht -kovalenten Verbindung zueinander und sind in einer zyklisch pentameren Struktur ringförmig zueinander konfiguriert (Thompson et al. 1999). Jeder Promoter kommt in der charakteristischen „Lectin -Form“ zu Darstellung, bestehend aus zwei β -Faltblatt Strukturen. Auf der Gegenseite ist eine einfache α -Helix zu finden. Humanes CRP bindet mit höchster Affinität an Phosphocholinreste und andere autologe und extrinsische Liganden. Es aggregiert oder präzipitiert die zelluläre oder molekulare Struktur, die diese Liganden trägt. Unter autologen Liganden sind zusätzlich native und modifizierte Plasmaproteine, verletzte Zellmembranen, eine Reihe von Phospholipiden, sowie deren Verbindungen, kleine nukleäre, ribonukleäre Proteine und deren Partikel, sowie apoptotische Zellen zu verstehen. Extrinische Liganden schließen eine Reihe von Glykanen, Phospholipiden und anderen Zusammensetzungen von Mikroorganismen mit ein, wie auch Kapsel- und somatische Anteile von Bakterien, Pilzen, Parasiten und pflanzlichen Produkten. Ein zweiter Effekt des CRP, der nach dem Binden des Liganden auftritt, gleicht einem der Schlüsseleigenschaften von Antikörpern, was ein Hinweis auf dessen Ursprung sein könnte. Dabei ist das CRP in der Lage unter bestimmten Umständen eine Immunreaktion zur Abwehr von Infektionen anzustoßen. Es übernimmt die Funktion eines proinflammatorischen Mediators und beteiligt sich an Physiologie und Pathophysiologie des in Gang gebrachten Prozesses. Hierzu ist aber zu sagen, dass diese Erkenntnisse größtenteils aus Tierversuchen gewonnen wurden und somit nur sehr eingeschränkt auf die menschlichen Gegebenheiten übertragbar sind. Aber der Umstand, dass es bis heute keinen Nachweis für eine CRP Defizienz oder eines Proteinpolymorphismus für das CRP gibt und darüber hinaus die CRP Struktur mit insbesondere seinen ligandenbindenden Eigenschaften für Phosphocholine und ähnlichen Substanzen in der Phylogenese sich so gut wie

nicht verändert haben, lässt den Schluss zu, dass das CRP einen wichtigen Beitrag zum Überleben leistet und es bis heute in der Evolution unverzichtbar ist.

1.3.3 Physiologie und Phylogenese des CRP

Die Steigerung der CRP Synthese in Hepatozyten wird maßgeblich durch Interleukine veranlasst, welche wiederum ihrerseits eine Steigerung durch den pathologischen Prozess in Form einer vermehrten Ausschüttung und systemischen Freisetzung in den Blutkreislauf erfahren. CRP ist, neben dem Serum Amyloid A Protein (SAA), das am schnellsten reagierende Agens, das eine Pathologie im Serum anzeigt.
Untersuchungen an gesunden, jugendlichen Blutspendern ergaben eine mediane CRP Blutkonzentration der Bevölkerung von 0,8 mg/l, die 90ste Perzentile liegt bei 3,0 mg/l und der Wert für die 99ste Perzentile wurde mit 10 mg/l angegeben (Shine et al. 1981, Pepys et al. 1981). Das Interessanteste und Auffälligste am Bestimmungswert des CRP ist dabei, dass dessen Serumkonzentration im Rahmen einer Akute Phase Reaktion bei Ausgangswerten von unter 50 µg/l enorm auf Spitzenwerte mit weit mehr als 500 mg/l ansteigen kann. Das entspricht einer mehr als 10 000 -fachen Steigerung seiner Serumkonzentration. Dabei korreliert das Maß der Steigerung der CRP Synthese mit dem Ausmaß des pathologischen Prozesses (Vigushin et al. 1993). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sobald der fördernde Stimulus kaum oder nicht mehr vorhanden ist, die CRP Plasma Konzentration rapide und sofort abfällt. Generell festzustellen ist allerdings, dass die CRP Werte der Bevölkerung weitestgehend, trotz der zu berücksichtigenden besonderen Eigenschaften des CRP, wie dessen hohe Geschwindigkeit für Anstieg und Abfall, seiner hohen Bandbreiten der Blutserumkonzentrationen und seiner Sensitivität, weitgehend konstant sind.
Das CRP gehört wie das Serum Amyloid A (SAA) zur Familie der Pentatraxine, eine Gruppe der kalziumabhängigen, ligandenbindenden Plasmaproteine, welche auf Grund ihrer elektronenmikroskopischen Erscheinung eines Fünfer –Beeren –Gebildes, ihren Namen erhalten haben. Diese Proteine sind insbesondere, im Vergleich zu vielen anderen Serumproteinen, über die Zeit der Evolution hinweg in einem hohen Maße konserviert worden. Sie haben sich also in deren Verlauf

kaum verändern können, da Veränderungen möglicherweise Nachteile in der Selektion bedeuten könnten. Es finden sich zum Bauplan des CRP homologe Eiweiße in allen Wirbeltieren, sogar auch beispielsweise in der sonst phylogenetisch sehr vom Homo sapiens entfernten Spinne, der Limulus polyphemus, oder auch die Pferdeschuhkrabbe genannt. In der Maus, die gerne als Modell zur Klärung physiologischer und pathologischer Mechanismen im Menschen herangezogen wird, ist CRP nur als Spur nachweisbar und erreicht in der Akute Phase Reaktion nie Werte über 2 mg/l (Baltz et al. 1982). Daher sind Mausmodelle und –versuche nur eingeschränkt und unter Vorbehalten auf die Abläufe im humanen Organismus übertragbar.

1.4 CRP und Atherogenese

Es konnte das CRP in der Arterienwand von atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden und es konnte gezeigt werden, dass CRP bei der Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen beteiligt ist. Epidemiologische Studien der letzten Jahre haben wiederholt eine Senkung der CRP -Plasmaspiegel durch Statine, also HMG –CoA –Reduktase Inhibitoren, gezeigt. Der dabei zugrunde liegende Mechanismus ist bis heute unklar. In zahlreichen in vitro -Untersuchungen wurden pleiotrope Effekte von Statinen auf vaskuläre Zellen nachgewiesen, die in der Summe zur Erklärung der antiatherogenen Wirkung der Substanzgruppe beitragen dürften. Statine werden in erster Linie hepatisch metabolisiert. Die Firma Aventis Pharma hat in einer systematischen Analyse, mit Hilfe eines High –Through put –Screenings (HTS), nach weiteren Substanzgruppen gesucht, welche die hepatozytäre CRP -Synthese inhibieren könnten. Dabei könnte die Reduktion des CRP Plasmaspiegels durch eine Inhibition der Synthese des CRP in Hepatozyten eine Strategie zur Prävention von kardiovaskulären Ereignissen sein und möglicherweise pharmakologisch genutzt werden. Um diesem Umstand nachzugehen gilt es ein Zellkulturmodell zu entwickeln, welches unter Laborbedingungen eine Aussage über die reguläre CRP Produktion, also der in vivo Produktion, in humanen Hepatozyten erlaubt und mit dessen Hilfe eine

quantitative Aussage über eine eventuelle Reduktion der CRP Synthese durch Zugabe putativ inhibitorischer Substanzen möglich wäre.

1.4.1 CRP und kardiovaskuläre Erkrankungen

Seit Mitte der Neunziger Jahre ist es mit schnelleren, sensitiveren Immunoassays bzw. der automatischen maschinellen Laborbestimmung möglich zu zeigen, dass hohe CRP Werte einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse darstellen. Dies weckte auch erstmals das Interesse am CRP in den USA, die in den letzten 30 Jahren weitgehend keine Relevanz des CRP und für dessen Bestimmung sahen. Die CRP Produktion ist Teil der unspezifischen Akute Phase Reaktion auf die verschiedenen Arten von Entzündungen, wie beispielsweise Infektionen oder Gewebeverletzungen. (Pepys et al. 2003). Natürlich erlaubt die CRP Bestimmung allein noch keine Aussage über ein eventuelles Ereignis oder dessen Ursprung und Ausmaß. Seine Interpretation bedarf deshalb stets der Gesamtsicht des sich präsentierenden Krankheitsbildes, seiner sich präsentierenden Klinik, sowie der sonstigen bestimmten Parameter.

In vielen Arbeiten ist der Zusammenhang zwischen gesteigerter CRP Produktion und der Schwere im Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen, wie Myokardinfarkten (de Beer et al. 1982), akuten Koronarsyndromen (Berk et al. 1990), Schlaganfällen oder peripheren Verschlusskrankheiten (pAVK) evaluiert worden. Dessen positive Korrelation konnte in einer ganzen Reihe von Studien belegt werden, nachdem es auch möglich war CRP hochsensitiv in schnellen, standardisierten, reproduzierbaren und weit verbreiteten Verfahren einheitlich zu bestimmen (Kuller et al. 1996, Tracy et al. 1996, Ridker et al. 1997, Koenig et al. 1999).

Es ist ersichtlich, dass die CRP Plasmawerte, ein in den meisten Fällen deutlicherer Parameter der Akute -Phase Antwort einer Entzündung als jeder andere bislang bekannte Parameter, der eine Infektion oder einen Gewebeschaden anzeigen könnte, sind. CRP Werte zeigen sich unbeeindruckt von tageszeitlichen Schwankungen oder von Ernährungsgewohnheiten der Individuen. Nur Leberschäden und sehr wenige Pharmaka, die den Signalweg der

Akute Phase Reaktion beeinflussen, haben einen reduzierenden Einfluss auf die CRP Produktion.

1.4.2 CRP und das Immunsystem

Mikrobiologische Infektionen sind eine der stärksten Selektionsfaktoren der Evolution. Das CRP hat einen wichtigen und schon sehr alten Stellenwert im angeborenen Immunsystem. Es gibt auch Hinweise darauf, dass das CRP eines der ersten Proteine, und somit zu Beginn der Evolution die Ursprünge eines Immunsystems darstellte, und sich viele der heutigen Komponenten unseres Immunsystems ihre Ursprünge im oder um das CRP fanden.
Phosphocholine finden sich in vielen Prokaryoten und sind in so gut wie allen Eukaryoten vorhanden (Harnett et al. 1999). Ein großer Teil der in der Keimbahn kodierten und in hohem Maße konservierten natürlichen Antikörper gleichen dem CRP in der Eigenschaft in seinem speziellen Merkmal eben diese Phosphocholine hochaffin zu binden. Die Charakteristik dieser Möglichkeit einer Bindung könnte sowohl eine Bedeutung für die Immunabwehr, als auch im Umgang mit autologen Grundbestandteilen, wie nekrotischen oder apoptotischen Zellen, haben (Pepys et al. 1983, Chang et al. 2002). Die Aktivierung des Komplementsystems führt zur Opsonisierung und damit zur Unterstützung der Phagozytose verschiedener Liganden. Darüber hinaus vermittelt das CRP proinflammatorische und pathophysiologische Effekte (Pepys et al. 1983). Die CRP Serumwerte stehen während des Auftretens eines entzündlichen Geschehens, in enger Korrelation mit denen anderer Marker oder von weiteren Proteinen der Akute Phase Reaktion, wie dem Fibrinogen, dem Albumin, oder dem Wert der Leukozyten (Danesh et al. 1998). Eine ähnliche prädiktive Eigenschaft konnte diesen Parametern, oder anderen Markern der systemischen Inflammation, wie dem SAA und den negativ Akute Phase Proteinen, wie Albumin oder der Blutsenkungsgeschwindigkeit, nicht zugeschrieben werden. Interessanterweise sind die Möglichkeiten des CRP eine Bindung mit autologen Liganden einzugehen höher als die von Anti -Phospholipid Antikörpern, welche in Zusammenhang mit frühen kardiovaskulären Erkrankungen bei Autoimmunerkrankungen stehen. Frühere Annahmen, nach denen CRP, mit seinem 10 000 -fachen Anstieg innerhalb von Stunden, sogar als Zytokin agieren

könnte oder als Modulator von spezialisierten Zellen oder physiologischen Prozessen angesehen wurde, haben sich bis heute nicht erhärten oder bewahrheiten können.

Bis heute sind die verantwortlichen Mechanismen, die in der allgemeinen Bevölkerung zum Anstieg der CRP Produktion, welcher ein Risiko für koronare Ereignisse darstellt, noch nicht entschlüsselt (Danesh et al. 2000). Auch ist die Verbindung zwischen erhöhten CRP Werten und der schlechteren Prognose einer schweren, instabilen Angina Pectoris oder im Zustand nach Angioplastien, bis heute nicht aufgedeckt (Liuzzo et al. 1994). Fest steht, dass die Atherosklerose mit in der Folge von Plaqueinstabilitäten entstehenden atherothrombotischen Ereignissen, einen entzündlichen Prozess darstellt. In einer ganzen Reihe von Untersuchungen wurde deutlich, dass dabei die entscheidenden Akute Phase Stimuli direkt aus den atherosklerotischen Läsionen stammen, also direkt am Ort des Geschehens produziert werden, wenngleich dies noch nicht bis ins letzte Detail aufgedeckt ist. Das Maß des Anstieges der Akute Phase Reaktion zeichnet ein Bild vom Ausmaß und der Schwere der atherosklerotischen Läsionen. Es ist bekannt, dass chronische, systemische und nicht vaskuläre Inflammationen die Atherosklerose fördern und akute, systemische und entzündliche Erkrankungen mit atherothrombotischen Ereignissen vergesellschaftet sind. Die steigende CRP Produktion, die bei einem solchen entzündlichen Ereignis gemessen werden kann, kann dabei auch aus anderen Körperregionen stammen, wobei es keine Korrelation mit serologischen Hinweisen bei diversen mikrobiologischen Infektionen, wie z.B. Chlamydia pneumoniae oder Helicobacter pylori gibt, für die es einschlägige Hinweise auf Zusammenhänge mit der Koronaren Herzkrankheit gab (Danesh et al. 2000).
Dem CRP kann sowohl die Eigenschaft zugeschrieben werden, Komplement zu aktivieren, als auch zu einer Entzündungsreaktion an den atherosklerotischen Plaques zu führen. Es gibt experimentelle Hinweise auf eine wichtige Rolle der Komplementaktivität im Prozess des Fortschreitens der Atherosklerose. Dabei wurde in Zellkulturen beobachtet, dass die Zugabe von CRP zu LDL eine Formation hin zu Schaumzellen fördert, die eine typische Eigenschaft der Atherosklerose sind (Zwaka et al. 2001). Dabei ist unklar ob dieser Vorgang die Opsonisierung der LDL Anteile durch das CRP darstellt, oder ob CRP damit

phagozytierende Zellen direkt anregt. In der Diskussion steht eine mögliche Bindung von CRP an eine Untereinheit des Fcγ -Rezeptors, was eine direkte Opsonisierung des Liganden ermöglichen würde oder eine entzündliche Reaktion auslösen könnte. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das CRP prokoagulatorische Eigenschaften besitzt, in dem es die Ausschüttung von Gewebefaktoren aus Blutmonozyten stimuliert (Cermak et al. 1993). Es konnte noch eine Vielzahl verschiedenster Effekte des CRP im Zellkulturmodell gezeigt werden, wie beispielsweise eine Steigerung der Exprimierung von Adhäsionsmolekülen oder die Modulation der NO Synthese.

Die Akute -Phase Reaktion, im Englischen auch als acute phase response (APR) bezeichnet, wird maßgeblich von den Zytokinen TNF -alpha, IL -1beta und von IL -6 reguliert. Diese drei tun dies allein, in Kombination, oder im Einklang mit Hormonen. Das Anaphylatoxin C5a, dass während einer Aktivierung des Komplementsystems generiert wird, induziert in vitro die Synthese dieser Zytokine durch Leukozyten und der Akute -Phase Proteine, was in Versuchen von Szalai an HepG2 Zellen gezeigt werden konnte. Die gleichen Zellen, wie sie in der vorliegenden Arbeit Verwendung finden. Dennoch gibt es keine eindeutige Evidenz für die Rolle des C5a oder eines anderen Komplement aktivierenden Produkts, in Hinblick auf die Regulation des APR in vivo. Szalais Untersuchungen verwendeten humanes C -reaktives Protein transgener Mäuse, die entweder für C3 oder für C5 defizient waren um herauszufinden, ob die Aktivierung von Komplement die Akute Phase Proteine CRP und/ oder Serum Amyloid P -Komponente induzieren. Ein Fehlen der Komplementfaktoren C3 oder C5 führte zu einer verminderten LPS -induzierten Up -Regulation des CRP Transgens und des Maus SAP Gens. Die Aktivierung des Komplementsystems durch das Schlangengift der Kobra führte zu einem signifikanten Anstieg des Serum CRP und des SAP in normokomplementären Mäusen, aber nicht in komplement -defizienten Mäusen. Die Injektion von rekombinantem humanem Komplementfaktor C5a in humane CRP transgene Mäuse induzierte die IL -1β Gene und verursachte eine signifikante Elevation der beiden Akute Phase Proteine CRP und SAP im Serum. Deutlich wurde, dass in humanen CRP transgenen IL -6 defizienten Mäusen, rekombinantes humanes C5a nicht zu einer Induktion der Gene für CRP oder für SAP führte. Aus diesen Ergebnissen kann der Schluss gefolgert werden, dass während der Akute Phase Reaktion C5a als

Konsequenz der Komplementaktivierung generiert wird und zusammen mit IL -6 und/ oder IL -1β in einem Anstieg der Proteinbiosynthese von CRP und von SAP mündet (Szalai et al. 2000).

1.4.3 CRP Anstiege im Serum

Als hauptsächlicher Auslöser dieser Konzentrationssteigerung konnte bei mehreren Untersuchungen das Interleukin 6 (IL -6) ausgemacht werden. Für andere Aktivatoren der CRP Synthese gibt es bislang lediglich Vermutungen. Die hepatische Synthese beginnt äußerst schnell bereits auf einen einfachen Stimulus hin, wonach die Serum Konzentration bereits nach 6 Stunden einen Wert von 5 mg/l erreicht, und ein Maximum der CRP Konzentration nach 48 Stunden zu erwarten ist. Die Plasma Halbwertszeit des CRP liegt bei 19 Stunden. Dies sind wichtige Vorüberlegungen, die bei einer Entwicklung eines Zellkulturmodells zur Quantifizierung der CRP Synthese unter bestimmten Stimuli beachtet werden müssen.

In einem Hep3B Zellmodell konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation dieser Zellen durch Interleukin 6 die CRP Expression steigerte und die Produktion von STAT3 und C/EBPbeta dadurch angeregt wurde (Voleti et al. 2005). Interleukin 1 fiel dabei durch einen synergistischen, verstärkenden Effekt für die Wirkung des Interleukin 6 auf. Die ersten 157 Basenpaare des proximalen CRP Promotors sind dabei die Andockstelle für das Interleukin 1, sowie für das NF -kappaB, ein Transkriptionsfaktor, welcher wiederum mit einem weiteren Transkriptionsfaktor, dem C/EBPbeta, synergistisch interagiert. Die große Bedeutung dieser Transkriptionsfaktoren im Umfang der Untersuchungen zeigt die zentrale Rolle von Transkriptionsfaktoren bei der CRP Expression und ist Grundlage der vorliegenden Arbeit.

Hauptsächliche Faktoren und Auslöser eines CRP Anstiegs sind vielfältig. Dazu gehören Infektionen mit Bakterien, oder systemisch mit Pilzen, Mykobakterien oder Viren, allergische Komplikationen von Infektionen wie das rheumatische Fieber oder ein Erythema nodosum, entzündliche Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis, ein Morbus Bechterew oder der Morbus Chron, die Colitis Ulcerosa, Nekrosen bei Myokardinfarkten, Operationen, Verbrennungen und

Frakturen, maligne Erkrankungen wie Lymphome, Karzinome und Sarkome. Dagegen gibt es auch eine Reihe von Erkrankungen, die sich durch eine geringe bis keine Antwort der Akuten Phase Reaktion und im weiteren Verlauf des CRP auszeichnen. Dazu gehören der Lupus erythematodes, die Sklerodermie, die Leukämie und die Graft versus Host Reaktion. Die Basis CRP Plasma Konzentration nimmt mit dem Alter zu, was auf das Auftreten klinisch nicht fassbarer pathologischer Prozesse zurückzuführen ist (Hutchinson et al. 2000). In Zwillingsstudien konnte gezeigt werden, dass der CRP Basiswert im Blut eine erbliche Komponente besitzt, welche unabhängig von Alter oder body mass index (BMI) zu finden ist. Es gibt Hinweise auf Zusammenhänge zwischen der CRP Produktion und einem genetischen Polymorphismus für das Antwortverhalten auf die Interleukine IL -1 und IL -6. Eine polymorphe GT Wiederholung im Intron des CRP könnte für die unterschiedlichen Basiswerte des CRP verantwortlich sein. Weiterhin führen diese abweichenden Gen Polymorphismen im Individuum, auch des CRP Gens selbst, nicht nur zu Unterschieden im Ausdruck unterschiedlicher Basiswerte des Plasma CRP Wertes, sondern auch zu CRP Produktionsabweichungen der Akute Phase Reaktion und schließlich beeinflusst dieser Umstand auch das klinische Outcome eines Patienten im Rahmen eines pathologischen Prozesses oder der CRP gestützten Immunantwort (Szalai et al. 2002). Nur geringgradige Erhöhungen der Basis CRP Werte werden als Zeichen einer chronischen Entzündung verstanden.

Bei dieser Sichtweise ist nicht außer Betracht zu lassen, dass der Grad der Antwort eines jeden Individuums auf Akute Phase Stimuli, die auf den Organismus einwirken und die Progression und die Komplikationen der Atherosklerose fördern, anders und unterschiedlich ist. Damit haben also Personen bei gleichem CRP Spiegel, unabhängig vom letztendlich auslösenden Grund, ein höheres Risiko ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleben, wenn sie so genannte „high responder“ auf Stimuli sind, also in höherem Maße mit einer Steigerung der CRP Expression reagieren als die Durchschnittsbevölkerung. Diese Disposition zum „high responder“ kann sowohl auf genetischen Grundlagen basieren als auch eine erworbene Eigenschaft sein. Es gibt einen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Wert des Basis CRP im Serum und dem body mass index, wobei Gewichtsverlust in der Folge zu einer Senkung des CRP Spiegels führt (Danesh et al. 1999). Im Weiteren führen erhöhte Basis CRP Level zu Insulin Resistenzen

und Metabolischen Syndromen bis hin zum Bild eines Diabetes Mellitus (Fröhlich et al. 2000, Chambers et al. 2001). Einen Hinweis auf diesen Zusammenhang lässt die Erkenntnis zu, dass Adipozyten maßgeblich an der Produktion des Basis IL -6 Spiegels beteiligt sind (Yudkin et al. 1999) und damit möglicherweise zu einem Teil auch zur Produktion des Basis CRP Levels beitragen könnten. Eine gesteigerte Anzahl an Adipozyten, wie sie bei der Adipositas vorliegen, könnten demnach zum Anstieg der beiden Werte für IL -6 und in der Folge auch für CRP mit erhöhten Basiswerten führen, ohne dass weitere pathologische Umstände vorliegen. CRP kann eine prädiktive Aussage über die Entwicklung eines Diabetes Mellitus Typ II machen, unabhängig von den klassischen, traditionellen Risikofaktoren (Freeman et al. 2002). Dabei konnte auch gezeigt werden, dass bei adipösen Patienten mit erhöhten CRP Werten diese gesenkt werden konnten, indem die Insulinresistenz durch Gewichtsreduktion verbessert wurde. Ein Zusammenhang zwischen CRP Werten und der Insulinresistenz ist allerdings wiederum gänzlich unabhängig vom body mass index (McLaughlin et al. 2002).

1.4.4 CRP und Pharmaka

Eine nicht ganz unerhebliche Tatsache ist zudem, dass auch Medikamente, die im physiologischen und nicht zwingend nur im pathophysiologischen Alltag verabreicht werden, zu gesteigerten CRP Basisspiegel führen können. So führen orale Kontrazeptiva (Fröhlich et al. 1999) und systemische, nicht aber die transdermalen, postmenopausalen Hormonersatztherapien, zu deutlich erhöhten CRP Spiegeln (Cushman et al. 1999, Ridker et al. 1999), ohne dass dabei beispielsweise ein Entzündung vorliegt, die sekundär einen Gewebeschaden oder andere entzündliche Reize bedeuten könnte. Im Gegensatz hierzu führen regelmäßige körperliche Bewegung und Sport (Ford et al. 2002) sowie ein Alkoholkonsum in Maßen (Imhof et al. 2001) zu einer Reduzierung der Basis CRP Werte. Andere klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie die Periodontalerkrankung oder das Rauchen, die ebenfalls erhöhte CRP Werte bei den Probanden aufweisen, scheinen sich eher auf lokale, nicht aber auf arterielle, inflammatorische Faktoren zurückführen zu lassen (Danesh et al. 1999).

Substanzen der pharmakologischen Klasse der beta 3 -Hydroxy -3 -Methylglutaryl (HMG) -Coenzyme A Reduktaseinhibitoren oder auch Statine genannt, senken die CRP Werte im Organismus, unabhängig von ihrem Effekt auf die Reduzierung des Lipidprofils (Ridker et al. 1999). Der Hintergrund dieses Sachverhalts ist dabei noch nicht vollständig geklärt. Ob dies ein direkter Effekt des Pharmakons auf Hepatozyten ist, eine antiinflammatorische Komponente in atherosklerotischen Plaques, oder ob generalisierte antiinflammatorische Wirkungen zu dieser Reduzierung führen gilt es noch zu erarbeiten. Ergänzend konnte in einigen Studien nachgewiesen werden, dass Statine das Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses gleichermaßen bei Patienten mit erhöhten LDL Cholesterin Werten, als auch bei solchen mit normalen LDL Cholesterin Werten, aber mit Basis CRP Werten über dem durchschnittlichen Median liegend, in dem selben Maße zu reduzieren vermögen (Ridker et al. 2001). Wenn sich diese Beobachtungen erhärten sollten, könnte das CRP zu einem prophylaktischen Indikator zur antiatherosklerotischen Therapie für ansonsten gesunde Patienten und Bevölkerungsgruppen werden. Es ist aber zu beachten, dass viele Erkrankungen zu einer Erhöhung der CRP Spiegel führen und diese oftmals unspezifisch ist. Arnaud hat kürzlich in diesem Zusammenhang eine Untersuchung veröffentlicht, die einen direkten Zusammenhang des CRP mit seinen proinflammatorischen Eigenschaften als proatherogenen Faktor deklarieren konnte. Er beschreibt den nachgewiesenen Umstand, dass Statine bewiesenermaßen kardiovaskuläre Ereignisse und die Mortalität sowohl bei Patienten mit, als auch bei solchen ohne koronarer Herzkrankheit reduziert (Arnaud et al. 2005).

Statine senken die Plasma CRP Werte im Blut. Arnaud konnte dabei zeigen, dass Statine dies über eine Reduzierung der IL -6 induzierten Protein und RNA Produktion in humanen Hepatozyten bewirken. Dabei beschreibt er die Steigerung der CRP Expression nach einer Bindung von IL -6 an den spezifischen Rezeptor, dessen Aktivierung über eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 von statten geht. Es liegen Hinweise vor, dass Statine möglicherweise genau diese Phosphorylierung und damit die notwendige Dimerisierung des STAT3 verhindern, ohne die es nicht zur Entfaltung seiner transkriptionsfördernden Wirkung und damit zur Steigerung der Zielprotein Expression des CRP kommt (Arnaud et al. 2005). Um das CRP als Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen verwenden zu können, gilt es genaue Basis CRP Werte zu haben, die nicht von

einfachen oder schweren pathologischen Prozessen verfälscht werden. Chronisch entzündliche Erkrankungen, wie beispielsweise die rheumatoide Arthritis oder die Hämodialyse bei Patienten im terminalen Nierenversagen, die einen ständig erhöhten CRP Wert zeigen, sind mit einem erhöhten Risiko ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleben, behaftet.

Mit eine der ersten Untersuchungen über die Rolle von STAT3 und seiner Teilhabe an der transkriptionellen Aktivierung des C -reaktiven Proteingens durch Interleukin 6, als das hauptsächliche Zytokin, zur Induktion der Transkription des humanen C -reaktiven Proteins während der Reaktion einer Akuten Phase, stellte Zhang im Jahre 1996 an. Die Mitglieder der signal transducers and activators of transcription Familie, die in dieser Zeit als die wesentlichen Mediatoren für die Wirkweisen vieler Zytokine, inklusive des IL -6 erkannt wurden, entfaltet im Allgemeinen seine Wirkung durch Bindung an palindromische Sequenzen, die ein TT (N) 5'-AA Motiv aufweisen. Er berichtet damals von einem, auf das IL -6 ansprechendes Element der proximalen Region des humanen CRP, an der 5'-gerichteten Region, welches eben dieses TT(N)5AA Motiv trägt. Er konnte zeigen, dass dies das CRP Akute Phase Response Element (CRP -APRE) ist. Die Versuche wurden an Hep3B Zellen durchgeführt und zeigten weitere Umstände, wie z.B. das IL -6, nicht aber das Interferon –Gamma, in der Lage war das Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) Konstrukt zu aktivieren, welches wiederum unter der Kontrolle des CRP Promotors steht und das CRP -APRE enthält. Eine Überexpression von STAT3 war in der Lage das CRP -CAT Konstrukt über das CRP -APRE zu aktivieren und konnte zudem die endogene CRP mRNA Akkumulation als Antwort auf einen IL -6 Reiz verstärken. STAT3 bindet dabei an das CRP -APRE als Antwort auf eine Ausschüttung von IL -6. Die Überexpression des STAT3, im Beisein von IL -6, war in der Lage die Expression des Konstruktes, welches das CRP -APRE enthält, zu induzieren und in schwächerer Weise auch den Thymidine Kinase Promoter der C/EBP Region anzusprechen. Zusammengefasst zeigt die Untersuchung, dass STAT3 eine einflussreiche Teilhabe an der transkriptionellen Aktivierung von CRP als eine Reaktion auf einen IL -6 Reiz hat (Zhang et al. 1996).

1.4.5 CRP und Lipide

Seit mehr als 60 Jahren ist bekannt, dass CRP eine Bindung mit Lipiden, speziell mit dem Lecithin (oder auch Phosphatidylcholin genannt) und mit Plasmalipoproteinen eingeht. Aber die ersten Hinweise auf eine Beziehung dieser Verbindung zur Atherosklerose kamen auf, als erkannt wurde, dass das kumulative, nicht aber das native, einzelne CRP, selektiv nur LDL und VLDL im Serum bindet (de Beer et al. 1982, Pepys et al. 1985). Dennoch bindet CRP kein oxidiertes LDL (Chang et al. 2002) und kein teilweise abgebautes LDL, wie es in atheromatösen Plaques zu finden ist. Das CRP wurde in einer Reihe von Untersuchungen ex vivo in den meisten dieser atheromatösen Plaques gefunden (Torzewski et al. 1998, Zhang et al. 1999).

Diese wichtigen Eigenschaften und die offensichtlich zentrale Rolle des STAT3 soll in der vorliegenden Arbeit bestätigt und mit Hilfe der Generierung eines Zellkulturmodells für weitere Arbeiten und Untersuchungsansätze einfach auswertbar und nutzbar gemacht werden.

Die wichtigsten sind:

1. CRP moduliert die Aktivität von Leukozyten. Während neutrophile Granulozyten in einigen physiologischen Eigenschaften inhibiert werden (Zhong et al. 1998), stimuliert CRP die Chemotaxis und die phagozytotischen Eigenschaften von Monozyten/ Makrophagen (Torzewski et al. 2000).
2. CRP aktiviert nach Aggregation oder einer Liganden Bindung das Komplementsystem über den klassischen Weg (Volanakis et al. 1982, Wolbink et al. 1996)
3. CRP bindet Calcium -abhänig an Apolipoprotein B -haltige Lipoproteine, wie z.B. LDL oder VLDL (de Beer et al. 1982, Pepys et al. 1985)
4. CRP bindet an beschädigte Zellmembranen, mikrobielle Polysaccharide, Phosphatidylcholin und an Histone (Gabay et al. 1999)

Ziel dieser Arbeit ist die Erstellung eines Zellkulturmodells zur Untersuchung von Transkriptionsfaktoren zur Steigerung der CRP Expression.

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien, Zellen, Zellkultur und Bakterienstämme

Im Folgenden eine Auflistung der verwendeten Zellen, Reagenzien, Zusätze und Geräte mit ihren Abkürzungen, ggf. ihren Bestandteilen, der Herstellerfirma und dem Sitz des Herstellers.

Verwendet wurde die kommerzielle maligne Zelllinie HepG2, die in Flüssig - Stickstoff (bei -183°C) aufbewahrt wurde und bei 37°C (98,6°F) zügig aufgetaut und anschließend, in 10ml IMDM aufgenommen, kultiviert wurde. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO_2 Gehalt in T-75 Flaschen kultiviert. Dreimal wöchentlich erfolgte ein Medienwechsel und einmal wöchentlich wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 mit Trypsin/EDTA passagiert.

Standardmedium: IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)
mit Zusätzen von:

- 10% FCS (Fetal Calve Serum, PAA Laboratories GmbH, Linz, A)
- 1% PSG (Penicillin/Streptomycin/L-Glutamine (200mM), Firma Invitrogen, Carlsbad USA)

OptiMEM® I Reduced Serum Medium, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SOC-Medium, GeneChoice, Inc., Frederick, MD, USA
Escherichia coli: INVαF' (TOP-10), Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypsin/EDTA Lösung 0,05% (w/v) Trypsin der Firma Biochrom KG, Berlin
Accutase, Innovative Cell Technologies, Inc., San Diego, CA, USA
PBS Phosphate Buffered Saline, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Humanes rekombinantes Interleukin-1 R&D Systems, Wiesbaden
Humanes rekombinantes Interleukin-6 R&D Systems, Wiesbaden
4α-Phorbol-12,13-Dibutyrat (PDBu), LC laboratories, Woburn, MA, USA
Falcons, Falcon
Zellkulturflaschen, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Antibiotika:

Neomycin (Geniticin G418), Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Penicillin/Streptomycin Firma Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Zeocin Firma Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Puromycin, pPUR Vector, Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA

2.2 Geräte

Brutschrank, Heraeus Holding GmbH, Hanau
Elektrophoresekammer Agagel Maxi, Biometra GmbH i. L., Göttingen
Entwickler-Kassette Hyperkassette, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
Kolorimeter, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA
Laminair Air Flow Bench Firma Heraeus, Hanau
Luminometer, Berthold Detection Systems, Pforzheim
Mikroskop, Carl Zeiss AG, Oberkochen
Röntgenfilm Hyperfilm, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
T3 Thermocycler, Biometra GmbH i. L., Göttingen
UV Leuchte, Fluo-Link FLX, Biometra GmbH i. L., Göttingen
Zentrifuge, Biofuge, Firma Heraeus, Hanau
Schüttelinkubator Certomat H, B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Software:
SigmaStat 3.1, Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA
Microsoft® Excel 2002, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft® Word 2002, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

2.3 Laborverbrauchsmaterialen

1kb-plus DNA-Ladder, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
CRP/ GAPDH -Primer, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
DNA Polymerase Hot Star Taq DNA Polymerase, Qiagen GmbH, Hilden
pcDNA™ 3.1, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
Primer Oligo(dT) 12-18 Primer, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
Puffer Buffer RT 10x, Qiagen GmbH, Hilden
Reverse Transskriptase Omniscript, Qiagen GmbH, Hilden
RNAse Inhibitoren RNAseOUT, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
STAT1 plasmid, Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA
STAT3 plasmid, Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA
STAT5A plasmid, Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA
STAT6 plasmid, Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA

Kits:

β-Gal Staining Kit, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
High Speed Plasmid Maxi Kit, Qiagen GmbH, Hilden
High Speed Plasmid Midi Kit, Qiagen GmbH, Hilden
Luciferase Assay System, Promega Corporation, Madison, WI, USA
Micro BCA Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA
QIAprep Spin Mini prep Kit, Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraktion Kit, Qiagen GmbH, Hilden
Restore™ Western Blot Stripping Buffer, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA
RNA-Isolationskit, Qiagen GmbH, Hilden

Antikörper:

STAT3 pAb (Crude serum), Rabbit Ig 100µl, Active Motif, Inc., Carlsbad, CA, USA
Monoclonal anti-α-Tubulin Clone B-5-1-2 Mouse Ascites Fluid Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Rabbit anti-Mouse IgG-HRP, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA

Transfektionsreagenzien:

Lipofectamine™ 2000 1mg/ml, Invitrogen life technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
PolyFect Transfection Reagent, Qiagen GmbH, Hilden
Superfect Transfection Reagent, Qiagen GmbH, Hilden

Puffer und Lösungen:

Lysis Puffer
50mM Tris/HCl 1M 12,5ml
100mM NaCl 5M 5ml
1% Triton X-100 100% 2,5ml
5mM EDTA pH 8,0 0,5M 2,5ml bei 0,1M 12,5ml ad 250ml Aqua bidest
+ Leupeptin 1000x, 4mM (-20°C)
+ PMSF 100x, 18ng/ml in EtOH (4°C)
+ Aprotinin 1000x, 3mM 4°C diese 3 Zusätze dienen als Proteasehemmer und müssen daher stets frisch zugegeben werden, gut gemischt und für 10 bis 20min inkubiert werden, danach Zentrifugieren für 10 min bei 15000 U/min und bei 4°C, anschließend verwerfen des Pellets.
1ml Lysispuffer: 1µl Leupeptin + 10µl PMSF + 1µl Aprotinin + 988µl Lysispuffer (alles auf Eis)

Probenlaufpuffer:

10% v/v Glycerol
4% v/v β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)
375mM Tris pH 8,8
2% w/v SDS
0,02% w/v Bromphenolblau 1+1 mit Volllysat

10x Laufpuffer :

10g SDS
30g Tris
144g Glycin
ad 1l Aqua bidest

Transferpuffer:

frisch angesetzt bei pH 8,3
20ml Methanol
0,6g Tris-Base
2,2g Glycin
ad 200ml Aqua bidest (180ml)

Blockpuffer:

5% w/v Magermilchpulver
1% w/v BSA
ad 1x PBS

Waschpuffer:

1l Waschpuffer: 100ml 10xPBS + 0,1% Tween 20 + 890ml Aqua bidest

Sonstiges:

Agar, Fluka Chemika, Buchs, CH
Agarose, Roche Mol. Biochem., Mannheim
BSA, Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Essigsäure, p.A., 33209, Riedel-de-Haen, Seelze
Ethanol, Fluka Chemika, Buchs, CH
Ethidiumbromide, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natronlauge, Merk, Darmstadt
Saranfolie, S.C. Johnson & Son, Inc., Racine, WI, USA
Sterifilter Nalgene Nunc Int., Rochester, MN, USA
Tris Base, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tryptone, Fluka Chemika, Buchs, CH
Yeast-Extrakt, Fluka Chemika, Buchs, CH

Zellkultur:

Für die Versuche wurden menschliche Leberzellen der malignen Hepatomzelllinie HepG2 aus der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen verwendet. Die Monolayerkultur wurde bei 37 °C und mit 5% CO_2 in Standardmedium inkubiert und musste alle drei bis sechs Tage passagiert werden, indem das Medium abgesaugt und 5ml PBS zugegeben wurden, um die Zellen und den Boden der Schale zu waschen. Die Zellen wurden anschließend mit Trypsin abgelöst und nach Zentrifugation, zur Trennung der Zellen vom Überstand, um auf neue Kulturflaschen verteilt werden zu können. Um möglichst keimarm arbeiten zu können, wurden alle Schritte unter einer Laminair Air Flow Bench durchgeführt.

Den subkonfluenten Zellen (durchschnittlich 70 bis 80% Konfluenz) wurden die unterschiedlichen Konzentrationen an menschlichem Interleukin 1β und 6 (R&D Systems) zugegeben. Die stimulierten Zellen wurden darauf für 24 Stunden erneut bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Die Zellen wurden mittels Lysisbuffer lysiert. Zur Isolierung der DNA aus den Zellkulturen, mit Hilfe des zugehörigen Qiagen Kits, wurde das Lysat durch mehrere Waschschritte mit den aus einem Protokoll vorgegeben Waschpuffern gewaschen, bis im letzten Schritt ein 30 µl DNA-Eluat übrig blieb. Anschließend wurden die DNA-Konzentrationen im Photometer gemessen, indem 5µl eines jeden DNA Eluats mit je 495µl bidest-H_2O verdünnt und seine optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ = 260 nm im Photometer bestimmt wurde. Jede Messung wurde jeweils dreimal durchgeführt und aus den ermittelten Werten anschließend der Mittelwert errechnet. Um den genauen Wert zu erhalten, musste man den Wert bei λ = 260.0 mit dem DNA-Faktor 50 und dem Verdünnungsfaktor, in diesem Fall mit 100, multiplizieren und erhielt dann die DNA -Menge in µg/ml.

2.4 PCR

Alle PCRs wurden mit dem Hot Star Taq Master Mix Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Hot Star Taq-Polymerase gewährt eine hohe PCR-Spezifität und erhöht die Ausbeute des spezifischen PCR Produktes, da sie eine modifizierte Form der 94 kDa Taq Polymerase darstellt. Das Enzym Taq-Polymerase stammt aus einem Bakterium, welches in heißen Quellen lebt und daher eine Polymerase mit diesen besonderen Temperatureigenschaften besitzt. Die $MgCl^{2-}$ und KCl^{-} Konzentrationen im Puffer lagen im Optimum. Die dabei angewendeten PCR Programme waren auf die Schmelztemperatur der Primerpaare und die Länge der zu amplifizierenden DNA Fragmente abgestimmt.
Zur Kontrolle eines positiven Befundes nach Klonierung des STAT3 Plasmids in den pcDNA 3.1 Vektor, sollte das erfolgreiche Einbringen des Transkriptionsplasmids in den Transfektionsvektor mittels einer PCR kontrolliert werden. Dafür wurde die DNA Konzentration auf 2µg/ml DNA verdünnt. Anschließend begann der Amplifikationsprozess der Erbinformationen für den zu untersuchenden Vektor. Der verwendete PCR Mix besteht aus dem Hot Star Taq Mastermix (dieser enthält bereits ein Gemisch der Desoxynukleosid -Triphosphate dATP, dGTP, dCTP, dTTP, sowie das Enzym Taq -Polymerase zur Verlängerung (Extension)), den Primern, Template und Wasser für die Reaktionslösung. Aufgrund der Thermostabilität der Taq -Polymerase wird das Reaktionsgemisch auf 95°C erhitzt, um den neu synthetisierten DNA-Abschnitt von der Matrize zu lösen. So wird eine neue DNA Syntheserunde eröffnet, und jeder weitere PCR-Schritt verdoppelt die Anzahl der DNA -Fragmente, wodurch die DNA-Menge exponentiell zunimmt.
Bei den beiden ersten Amplifikationsschritten entstehen ausschließlich DNA-Stränge, die länger sind als die definierte Zielsequenz. Erst ab dem dritten Zyklus erhält man Amplifikate definierter Länge. Nach 30 Zyklen wurden die Amplifikationsprodukte mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Ethidiumbromidfärbung im UV-Licht sichtbar gemacht.
Nachdem mit dieser PCR gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 3.2), dass die Klonierung des STAT3 DNA Plasmids in den pcDNA 3.1 Transfektionsvektor Erfolg hatte wurde nach dem Vorgang der stabilen Transfektion in die Hep G2 Zellen eine erneute PCR mit dem selben beschriebenen Protokoll durchgeführt,

dass den Nachweis des STAT3 Plasmids in den HepG2 Zellen nach erfolgreicher Einbringung des Transfektionsvektors beweisen sollte. Dabei kam noch eine parallel ablaufende PCR zum Nachweis von GAPDH hinzu. Da nämlich die DNA Synthese mit unterschiedlicher Effizienz verlaufen kann und daher die Quantifizierung nur einen Hinweis über die Mindestmenge an DNA im Ansatz und keinen absoluten Wert liefert, musste nach erfolgreicher stabiler Transfektion ein interner Standard eingeführt werden. Dazu wurde das „housekeeping gene" GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) verwendet, welches in HepG2 Zellen in konstanter Menge exprimiert wird und somit ein Maß für die zelleigene Proteinbiosynthese darstellt und somit nicht zuletzt auch ein Verhältnis für die Produktion von STAT3 in der Zelle anzugeben erlaubt.

Der PCR Ansatz zum Nachweis von STAT3 sah wie folgt aus:

Tabelle 1: PCR (Polymerase Chain Reaction) Ansatz zum Nachweis von STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) in den HepG2 Zellen nach stabiler Transfektion und einer GAPDH (Glyseraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) Gen Kontrolle zur Überprüfung konstanter Proteinmengenproduktionen der HepG2 Zellen

Bezeichnung	Menge
Hot Star Taq Master Mix	25µl, enthält 2,5 Einheiten DNA Polymerase, 1x PCR Puffer und 200µM eines jeden dNTPs (Desoxyribonukleotid Triphosphats)
STAT3 Primer/GAPDH Primer 1 forward	0,5µM
STAT3 Primer/GAPDH Primer 2 reverse	0,5µM
Vektor DNA	1µg
Total	50µl

Die Primersequenzen für die STAT3 PCR sahen wie folgt aus:

Tabelle 2: Primersequenzen für STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) für die PCR in Tabelle 1

Anfangs Primer (forward)	CCT GGG CAT GGA GTC CTG TGG
End Primer (reverse)	CTG TGT TGG CGT ACA GGT CTT

Die Primersequenzen für die GAPDH PCR sahen wie folgt aus:

Tabelle 3: Primersequenzen für GAPDH (Glyseraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) Gen Kontrolle zur Überprüfung konstanter Proteinmengen-produktionen der HepG2 Zellen für die PCR in Tabelle 1

Anfangs Primer	GAG ATG ATG ACC CTT TTG
End Primer	GTG AAG GTC GGA GTC AAC

Die Schritte im Thermocycler für die STAT3 PCR waren wie folgt:

Tabelle 4: Schritte im Thermocycler für STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) für die PCR in Tabelle 1

Schritt	Temperatur	Zeit	Vorgang	
1	95°C	15 Minuten	Vorbereitung	
2	94°C	30 Sekunden	Denaturierung	}
3	55°C	30 Sekunden	Annealing	}
4	72°C	40 Sekunden	Elongation	35x
5	72°C	10 Minuten	Ende	

Gesamtzeit pro Durchlauf: 100 Sekunden oder 1 Minute und 40 Sekunden
Gesamtzeit der STAT3-PCR bei 35 Durchläufen: 83 Minuten und 20 Sekunden

Schritte im Thermocycler für die GAPDH PCR:

Tabelle 5: Schritte im Thermocycler für GAPDH (Glyseraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) für die PCR in Tabelle 1

Schritt	Temperatur	Zeit	Vorgang	
1	95°C	15 Minuten	Vorbereitung	
2	94°C	40 Sekunden	Denaturierung	}
3	55°C	40 Sekunden	Annealing	}
4	72°C	1 Minute	Elongation	35x
5	72°C	10 Minuten	Ende	

Gesamtzeit pro Durchlauf: 140 Sekunden oder 1 Minute und 20 Sekunden
Gesamtzeit der GAPDH -PCR bei 35 Durchläufen: 106 Minuten und 40 Sekunden

Die Schritte 2 bis 4 wurden jeweils 35-fach wiederholt und das Reaktionsprodukt, zur besseren Haltbarkeit, auf 4°C abgekühlt. Das STAT3 PCR Produkt wurde auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen und lief bei 120 Volt für eine Stunde. In der Elektrophoresekammer wurden die Fragmente mit 1xTAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer aufgetrennt, das Gel daraufhin für 10 min in ein Ethidiumbromidbad getaucht und die DNA mit UV-Licht sichtbar gemacht. Damit konnte gezeigt werden, dass die Klonierung des STAT3 Vektors in das Neomycin Plasmid (pcDNA 3.1), zur Vorbereitung einer stabilen Transfektion in HepG2 Zellen, erfolgreich war und das Ziel Plasmid, die STAT3 Gensequenz, erfolgreich und vollständig in den neuen Vektor eingebracht werden konnte. Die zweite PCR (mit GAPDH Kontrolle) nach stabiler Transfektion des Vektors in HepG2 Zellen konnte den Beweis der erfolgreichen Einbringung durch den Nachweis genau derselben STAT3 Gensequenz liefern. Die Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse der

Gelelektrophorese im aufgetrennten Zustand, mittels Ethidiumbromidfärbung im UV-Licht.

2.5 Western Blot

Es sollte ein Westernblot zum Nachweis von STAT3 in den stabil transfizierten HepG2 Zellen durchgeführt werden. Dazu sollten 60µg Probenprotein aufgetragen werden. Zunächst erfolgte daher eine Proteinbestimmung in einer 96 well Elisaplatte, für alle Proben jeweils in Doppelbestimmung.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der kolorimetrischen Methode bei einer Wellenlänge von λ = 562 nm.

Der Micro BCA Protein Assay Kit zur Proteinbestimmung besteht aus:

Tabelle 6: Aufbau des Micro BCA (2,2'-Bichinolin-4,4'-Dicarbonsäure) Assay Kits zur kolorimetrischen Proteinbestimmung vor Western Blot

Micro BCA Reagenz A (MA)	Micro BCA Reagenz B (MB)	Micro BCA Reagenz C (MC)
Natriumkarbonat, Natriumbikarbonat und Natriumtartarat in 0,2N NaOH	4% BCA in H_2O	4% Cupricsulfatpenta-hydrat in H_2O

Diese drei Komponenten wurden zu den zu untersuchenden Proben in zwei Versuchsreihen mit Verdünnungen des besagten Probenproteins von 1:100 und von 1:200 zugegeben. Alle Ansätze lagen in Doppelbestimmung vor. Nach 60 minütiger Inkubation bei 60°C erfolgte die rechnergestützte Proteinbestimmung im Kolorimeter bei einer Wellenlänge von λ = 562 nm über die optische Dichte. Den Wert in Milligramm Protein pro Milliliter Probe erhält man durch Auftragen der kolorimetrischen Werte auf der Standardkurve.

Zunächst wurden die Zellen gewaschen, danach von den Oberflächen der Kulturflaschen oder -schalen abtrypsinisiert, in Falconbehälter überführt und mittels Zentrifugieren zur Auftrennung gebracht. Es folgte die Zelllyse zur Freisetzung der Zellinhalte. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe der Biuret-Methode und entsprechender Verdünnung liefen die Proben im SDS (Sodium Dodecyl- oder auch Lauryl-Sulfat) Polyacrylamid Elektrophoresegel um anschließend dem Blot aufgelegt werden zu können.

Zunächst wurde die Membran für 3 bis 5 Minuten in Transferpuffer gelegt, sowie das Filterpapier mit Transferpuffer befeuchtet. Es galt den Blot wie folgt aufzubauen: von oben nach unten: 1 Filterpapier, Gel (Polyacrylamidgel), Membran, 1 Filterpapier.
Die Proben wurden für 1 Stunde bei 150 mA (Blottgerät: Biorad) eisgekühlt zum Blotten gegeben und anschließend das Gel mit Coomasie angefärbt und danach überschüssige Farbe mit Entfärber entfernt. Coomasie ist die meist benutze Färbemethode zur Detektion von Proteinen. Es ist sogar die Methode der Wahl wenn SDS bei der Gelelektrophorese der Proteine benutzt wurde und ist besonders sensitiv für den Bereich zwischen 0,5 bis 20 Mikrogramm Proteinnachweis. In diesem Bereich folgt es dem Lambert-Beer Gesetz und erlaubt damit nicht nur quantitative sondern auch qualitative Aussagen über den Proteinnachweis. Das Gesetz von Lambert und Beer beschreibt die durch eine chemische Verbindung bedingte Lichtabsorption wie folgt: $\Delta E = \varepsilon_{mol} \bullet c \bullet d$

Für unseren verwendeten Ansatz genügte allerdings mittels Coomasie zu zeigen, ob der Blot Ansatz den gewünschten Nachweis erbringt, oder ob Proteine auf dem Gel zurückgeblieben sind und damit nicht ins Ergebnis eingegangen wären.

Das Blocken erfolgte in blocking solution bei einer Temperatur von 4°C über Nacht schüttelnd im Kühlfach. Am nächsten Tag folgten die Zugaben der Antikörper.
Zu verwendeten Reagenzien und Puffern dabei siehe oben. Als Erstantikörper wurde der Antikörper gegen STAT3 angewandt (Active Motif) in einer Verdünnung von 1:300 = 33µl in 10ml blocking buffer. Der Blockpuffer enthielt den Zweitantikörper Anti-rabbit-HRP im Verhältnis 1:2000

1. Antikörper: Verdünnt in blocking solution über Nacht schütteln bei 4°C, anschließendes Waschen mit Waschpuffer: 1 x 2 min und 5 x 5 min
2. Antikörper (HRP konjugiert): verdünnt in blocking solution für 1 Stunde bei Raumtemperatur schütteln. Darauf Waschen mit Waschpuffer: 5 x 5 min

Zur Sichtbarmachung (Detektion) des Blotergebnisses wurde das Detektionsreagenz (ECL) im Verhältnis 1:1 gemischt (10ml + 10ml). Beim Zusammentreffen der Reagenzien werden die photoaktiven Eigenschaften des Produktes aktiviert, wobei das HRP des zweiten Antikörpers eine Enzymfunktion besitzt und mit der ECL Substanz reagiert und über eine photoaktive Reaktion eine Abbildung der Westernblotbanden mittels Belichtung von Röntgenfilmen ermöglicht. Die Blotmembran wurde in diesem Zusammenhang für 1 min inkubiert und darauf sofort in die Filmkassette mit ausgelegter Folie gelegt. Darauf folgte die sofortige Auflage des Films und nach einer durchschnittlichen Belichtungszeit von 15 min konnte der Film entwickelt werden. Die Membran wurde in Folie bei 4°C aufbewahrt.

2.6 Transfektionen

Es gibt eine ganze Reihe von Methoden DNA in Zellen zu bringen, jedoch bei allen Methoden besteht das Problem, dass die Transfektionseffizienz sehr stark vom Zelltyp und den jeweiligen Bedingungen des Versuchs, sowie der Umgebung abhängt. Nach anfänglichen Schwierigkeiten ein geeignetes Transfektionsreagenz zu finden gelang uns dies schließlich und die Versuche konnten beginnen. Die Idee der Transfektion der HepG2 Zellen war, alle Zellen sowohl mit dem CRP Promotor, als auch mit den verschiedenen zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren der STATs 1 bis 6 zu transfizieren. Als CRP Promoter wurde ein -1000bp CRP Promoterkonstrukt verwendet, welches die letzten tausend Basenpaare des CRP Promotors enthält und mit dem Luciferasegen im PGL basic Vektor von Promega gekoppelt ist, was für die anschließende Auswertung eine wichtige Rolle spielt. Diese Verbindung lässt also nur eine Luciferaseaktivität im Luminometer zu, wenn das Promotorkonstrukt erfolgreich transfiziert wurde und damit auch der CRP Promotor in der Zelle angekommen ist.

Transiente Transfektionen:

Zunächst wurden die HepG2 Zellen dazu transient transfiziert. Dazu wurden aus über einer Woche bebrüteten T-75 Flaschen aus niedrigen Passagen, 2 x 24 well Platten mit HepG2 Zellen ausplattiert mit je ca. 200 000 Zellen/well bestückt. Die Transfektion erfolgte mit 1µg DNA, bestehend aus 0,5 µg des -1000bp CRP/Luc Promotorkonstrukts und 0,5µg der STATs 1 bis 6 oder, zu Kontrolle, dem CMV/ PGL basic Leervektor. Diese transienten Transfektionen wurden bei allen Varianten mit je 2,5µg des Lipofectamine™ 2000 Transfektionsreagenzes ausgeführt. Diese Konzentrationen entsprachen den Empfehlungen des Herstellers für diesen Zelltyp. Nach 20 minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Mix den Zellen zugegeben, da diese Zeit das höchste Maß an DNA/Lipofectamine™ 2000 Komplexbildung verspricht und somit das Eindringen der genetischen Informationen in die Zellen am besten ermöglichen sollte. Die höchste Transfektionseffizienz ist bei einer Zelldichte von 90% bis 95% Konfluenz der Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion zu verzeichnen, die

entsprechenden Zellzahlen sind am Vortag mit 70% bis 80% Konfluenz auszuplattieren gewesen, um am Tag der Transfektion die geforderte Dichte von 90% bis 95% Konfluenz zu erreichen. Zur Verbesserung des Transfektionsergebnisses wurde zudem das serumfreie Medium OptiMEM® I Reduced Serum Medium zur Verdünnung des Transfektionsansatzes verwendet, da serumhaltige Medien die Transfektionen behindern können. Nach 24 Stunden Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO_2 erfolgte die Stimulation der transfizierten Zellen mit 10ng/ml IL-1 und der Kombination aus 10ng/ml IL-1 + 10ng/ml IL-6. In jedes well wurde jeweils 1 ml Medium zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden Bebrütung wurden die behandelten Zellen anschließend mit 500µl PBS/well gewaschen, abtrypsinisiert und mit 200µl verdünntem Lysis Buffer (Cell Culture Lysis Reagent CCLR) für 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde der Inhalt der wells samt Lysis Buffer in Eppendorf Tubes pipettiert und auf Eis gelagert. Die Tubes wurden für 2 Minuten bei 4°C zentrifugiert und 20µl des Überstands in Luminometerassayröhrchen gegeben, die wiederum in das Luminometer für den Luciferase Assay eingesetzt wurden. Daraufhin konnte der Luciferase Assay nach einem vorgegebenen Programm gestartet.

β-Gal Test zur Transfektionseffizienz:

Mit Hilfe des β-Gal Staining Kit von Invitrogen wurde die Transfektionseffizienz überprüft. Das β-Gal Staining Kit erlaubt eine Aussage über den prozentualen Anteil der transfizierten Zellen durch Anfärbung der Expression von LacZ. LacZ ist ein bakterielles Gen, welches hauptsächlich seine Verwendung als Reporterkonstrukt in eukaryoten Transfektionsexperimenten findet. Das Genprodukt von LacZ, die β-Galaktosidase, ist resistent gegen Proteolyse in Zelllysaten und ihre Aktivität kann sehr einfach bestimmt werden. Die β-Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse von X-Gal, wobei es zur Produktion einer blauen Farbe kommt, die sehr gut unter dem Mikroskop sichtbar ist und somit ist mittels der Quantität ihrer Farberscheinung in den transfizierten Zellen eine Aussage über die Transfektionseffizienz der behandelten Zellen möglich. Nach 20 Minuten Inkubationszeit konnte also per Farbmarkierung die Transfektionseffizienz

der HepG2 Zellen unter dem Mikroskop beurteilt werden. Im Schnitt lag sie für die HepG2 Zellen mit Lipofectamine im Bereich von 40%.

Antibiotikaselektion:

Die Konzentration von 1000µg/ml G418 wurde aus Vorversuchen ermittelt (siehe Abschnitt 3.2 und Tabelle 9), in dem eine Toxizitätskurve, oder auch Todeskurve genannt, für die HepG2 Zelllinie erstellt wurde. Es wurde eine 24 -well Platte mit je ca. 200 000 Zellen pro well HepG2 Zellen ähnlicher Passage ausplattiert und mit 24 verschiedenen aufsteigenden Konzentrationen, von 200 µg/ml bis 2000 µg/ml der verschiedenen Antibiotika, behandelt um die minimal toxische Neomycin (G418) bzw. Zeocin Konzentration für die HepG2 Zellen zu bestimmen. Im Rahmen der Verdünnungsreihe zeigte sich bei Zugabe von jeweils 1000 µg/ml Neomycin (G418) bzw. Zeocin, die deutlichste Grenze zwischen der selektiven und minimal toxischen Wirkung des Antibiotikums.

Klonierung von STAT3 in den pcDNA 3.1D Vektor:

Die DNA Klonierung zu Abschnitt 2.6 erfolgte in vier Arbeitsschritten:

1. Konstruktion eines rekombinanten Moleküls durch Ligation der Ziel-DNA mit einem Vektor
2. Transfer des rekombinanten DNA-Moleküls in eine Wirtszelle, in der es unabhängig von den Chromosomen der Wirtszelle repliziert werden kann (Vorgang der Transformation)
3. Selektion der Zellklone auf antibiotikahaltigen Agarplatten, worauf einzelne Klone von der Platte gepickt werden und in Flüssigmedium zur weiteren Kultivierung angesetzt werden
4. Isolation der rekombinanten DNA aus der Kultur eines Klons

Zunächst galt es die passenden Restriktionsenzyme für das Ausschneiden des STAT3 Gens aus seinem Vektor zu finden. Dafür fanden sich die Restriktionsenzyme Sac I (erkannte Sequenz GAGCTC/CTCGAG), welches im CMV Promotor schneidet und der Restriktionsendonuklease Pme I, welche nach dem Stopp Codon ihren Schnitt setzt (erkannte Sequenz GTTT/AAAC). Es wurde folgender Verdauungsansatz mit je 2 Proben (in Doppelbestimmung) gewählt:
jede Probe enthielt:

Bezeichnung der Restriktionsenzyme mit ihren Mengen bei STAT3 Klonierung:

Tabelle 7: Ansatz zum Ausschneiden von STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) mittels der Restriktionsenzyme Pme I, Sac I (Endonukleasen) in NEB4 (Eigennamen) in BSA (Bovinem Serum Albumin) aus dem pcDNA 3.1 D Vektor (Eigenname des Herstellers)

Bezeichnung	Verdünnung	Menge
BSA	1:100	0,6µl
NEB4	1:10	6µl
Pme I	40 U	4µl
Sac I	40 U	2µl
	Total:	12,6µl

In die eine Probe wurden dann 20µl pcDNA 3.1D Vektor und 37,4µl H_2O gegeben, in die andere 4µl STAT3 Vektor und 43,4µl H_2O. Beide Proben wurden bei 37°C für 90 Minuten inkubiert. Dann wurde 1µl CIP auf die pcDNA Probe gegeben und diese erneut für 1 Stunde inkubiert. Unter dem Vorgang des CIPpens versteht man ein Verfahren, um eine Religation linearisierter Vektoren bei Klonierungsstrategien zu vermeiden. Es müssen die 5'-Enden von der Alkalinen Phosphatase CIP (Calf Intestinal Phosphatase) entphosphoryliert werden. Der Hintergrund durch Klone ohne Insert wird dadurch deutlich vermindert. Während dieser Prozedur wurde die STAT3 Probe auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen um bei 120 Volt eine Stunde lang zu laufen. Nach Sichtbarmachung der Bande durch ein 10 minütiges Ethidiumbromidbad wurde die Bande ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen behandelt.

Die optische Konzentrationsmessung des DNA Gehalts erlaubte eine Lösung von 1µl DNA auf 100µl H_2O. Daraufhin erfolgte der Vorgang der Ligation zur Zusammenführung der DNA, bei 16°C für fünf Stunden im Thermocycler mit 4µl T4-DNA-Ligase und 1/10 des Volumens des 10 x T4 Ligasepuffers. Das molare Verhältnis von Vektor- und Insert DNA soll dabei ca. 1:3 betragen. Zur Optimierung des Vorgangs wurde vor der Ligation noch eine DNA Konzentrationsmessung durchgeführt. Danach wurden pro Versuchsansatz je 5µl DNA in -80°C Escherichia coli Kulturen gegeben, die für 30 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Es folgte ein Hitzeschock für die E. colis in einem 42°C warmen Wasserbad für 30 Sekunden und anschließend die Zugabe von 250µl SOC. SOC ist eine Form eines speziellen Zellkulturmediums und bewirkt eine große Transformationseffizienz. Es enthält 0,5% Hefeextrakt, 2,0% Tryptone, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM $MgCl^2$, 20mM $MgSO^4$ und 20mM Glukose. Dieser Vorgang des Hitzeschocks erlaubt das Eindringen der DNA in die Bakterienkultur zur Transformation. Die Proben wurden daraufhin für 30 Minuten bei 300 rpm und bei 37°C geschüttelt. Zur Koloniebildung wurden 2 Nährplatten mit unterschiedlichen Ansätzen gewählt. Die eine LB-Amp-Platte wurde mit 50µl der Bakterien geimpft, die andere mit 250µl und über Nacht (nicht länger als 16 Stunden) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Transformation der Vektorkonstrukte werden konventionell mit INVαF', einer chemischen Komponente von E. coli, nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Für die DNA-Präparation wurden die einzelnen Klone gepickt und bei 37°C in 3ml LB-Amp-Flüssigmedium auf dem Schüttler bei 225rpm für 16 Stunden kultiviert. 100µl der Bakteriensuspension eines jeden Klons wurde entnommen, mit der gleichen Menge sterilgefiltertem 75% Glycerol gemischt und als Backup bei -80°C gelagert. Die hochreine Plasmid DNA wurde mittels Plasmid Mini-, Midi- bzw. Maxiprep Kit, entsprechend den Angaben des Herstellers, isoliert.

Zur Kontrolle erfolgte ein Probeverdau des Maxipreps Resultats bestehend aus:

Tabelle 8: Ansatz zum Ausschneiden von STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) mittels der Restriktionsenzyme Pme I, Sac I (Endonukleasen) in NEB4 (Eigennamen) in BSA (Bovinem Serum Albumin) aus dem neu klonierten Vektor als Probeverdau zur Erfolgskontrolle

Bezeichnung	Menge
DNA aus STAT3 und pcDNA 3.1D	2µl
Sac I	0,5µl
Pme I	0,5µl
BSA	0,2µl
NEB4	2µl
H_2O	14,8µl
Total	20µl

Die Inkubationszeit für den Probeverdau betrug eine Stunde bei 37°C im Brutschrank. Es folgte die Auftragung der Probe auf 1,5% Agarosegel und nach dem Laufen daraufhin für 45 Minuten ergab sich nach einem Ethidiumbromidbad das erwartete positive Umklonierungsergebnis.

Stabile Transfektionen:

Um eine stabile Transfektion von HepG2 Zellen durchzuführen, die ständig die Gene des -1000bp CRP/Luc Promotorkonstrukts sowie des STAT3 Gens in ihrem eigenen Genom eingebaut tragen und fortwährend replizieren, wurde folgender Ansatz gewählt:

Zur Selektion der stabil transfizierten HepG2 Zellen von den nicht transfizierten Zellen wurde die Methode einer Antibiotikaselektion gewählt. Es galt somit nicht nur das Plasmid für STAT3 und das CRP Promotorkonstrukt in das Genom der HepG2 Zellen stabil zu integrieren, sondern auch noch einen Antibiotikaselektionsvektor in die Zellen mit einzubringen, der den Selektionsvorgang der erfolgreich stabil transfizierten Zielzellen von denen zu unterscheiden vermag, welche diesen Vorgang nicht erbracht haben. Zunächst wurde versucht die Zellline der ABEK14 Zellen, die als Ausgangszelllinie ebenfalls die HepG2 Zellen haben und bereits stabil mit dem CRP/Luc Promotorkonstrukt transfiziert sind, mit den Plasmiden für STAT3 und für das Antibiotikum erneut stabil zu transfizieren. Nach mehreren erfolglosen Ansätzen wurde der Entschluss gefasst die Ausgangszelllinie der HepG2 Zellen mit allen 3 Plasmiden direkt und neu zu transfizieren. Auch diese Versuchsreihe, mit unterschiedlichen Konzentrationen und Bedingungen durchgeführt, misslang, da stets nur ein Transfektionserfolg für maximal zwei Plasmide möglich war. Aus dieser Erfahrung heraus wurde das STAT3 Gen in den Antibiotikaselektionsvektor (bevorzugt das Neomycin), welches aus einem pcDNA3.1 Vektor der Firma Invitrogen besteht, kloniert. Es waren mehrere angepasste Versuchsansätze zu den Transfektionsversuchen nötig um schließlich eine erfolgreiche stabile Transfektion mit den geforderten Genkonstrukten zu erhalten. Dabei wurden sowohl unterschiedliche DNA Volumina, verschiedene Antibiotika samt angepasster Konzentrationen zur Selektion, als auch unterschiedliche Transfektionsreagenzien ausprobiert, von denen viele Versuche nicht zum Erfolg führten. Neomycin stellte sich bei diesen zahlreichen Ansätzen als das viel versprechendste Selektionsantibiotikum heraus. Ein doppelt positiver Klon konnte schließlich für die Kombination des neu klonierten Vektors STAT3/Neomycin (G418) sowie des CRP/

Luc Promotorkonstruktes mit Lipofectamine™ 2000 für 1mg/ml ausgemacht werden.
Jeweils 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen im Verhältnis von 1:10 gesplittet und es begann die Antibiotikaselektion mit der zuvor als Optimum bestimmten Antibiotikakonzentration von 1000µg/ml des Antibiotikums Neomycin (G418).

Nach einer Wachstumszeit von ca. drei Wochen waren die ersten stabil transfizierten Klone makroskopisch sichtbar. Diese wurden gepickt und zunächst in 24 well Platten, später in T-25 und schließlich in T-75 Flaschen kultiviert. Die Antibiotikaselektion impliziert den erfolgreichen Einbau des STAT3/ Antibiotikagenkonstrukts und damit war für die gewonnen Klone noch die Austestung in Hinblick auf ihre Luciferaseaktivität nötig, die den Einbau des zweiten Vektors, des -1000bp CRP/Luc Promotorkonstruktes beweisen würde. Für den Luciferase Assay wurde 24 Stunden nach Ausplattieren von ca. 200 000 Zellen pro well die Stimulation erneut mit 10ng/ml IL-1, 10ng/ml IL-6 und der Kombination von 10ng IL-1 + 10ng/ml IL-6, sowie zusätzlich mit 100nM PDBu und einer Kombination aus allen drei Stimulanzien mit 10ng/ml IL-1 + 10ng/ml IL-6 + 100nM PDBu in jeweiliger Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.7 Luciferase Assay

Um eine Aussage über den Inhalt von DNA Sequenzen zu machen werden in der Zellbiologie häufig so genannte Gen -Reporter verwendet, die die Expression von Genen und anderen zellulären Ereignissen, wie z.B. Rezeptoraktivitäten, intrazelluläre Signaltransduktion, mRNA Expression, Proteinkonfiguration und Protein-Protein-Interaktionen, die von einer Genexpression abhängen, auswertbar machen. Das Verfahren des in dieser Arbeit verwendeten Luciferase Assays bietet bei dieser Fragestellung folgende Vorteile:

1. Es bietet nach der Translation eine sofortige Auswertbarkeit der Reporteraktivität, da das Protein keinerlei posttranslationellen Prozessen zu unterliegen hat, die es verändern könnten.
2. Der Assay ist sehr sensitiv, da seine Lichtproduktion eine höchst quantitative Effizienz im Vergleich zu anderen Chemolumineszenzreaktionen aufweist und dabei keinerlei Hintergrundlumineszenz in den Zellen oder am Assaysystem zu finden ist.
3. Die Durchführung des Assays ist zügig möglich, da die eigentliche Lumineszenzreaktion nur wenige Sekunden dauert.

Die Lichtreaktion des Luciferase Assay Systems beruht auf einer Konvertierung von chemischer Energie der Luciferinoxidation durch Elektronenübergang, wobei das Molekül des Oxyluciferin das Reaktionsprodukt darstellt. Luciferase ist ein monomeres 61 kDa schweres Protein, das die Oxidation von Luciferin katalysiert. Als Kosubstrate dieser Reaktion kommen ATP und Mg^{2+} zum Einsatz. Bei der Anwendung des Luciferase Assay Systems entsteht bei der oben beschriebenen chemischen Reaktion, ein Lichtblitz der sofort erlischt, sobald sich Enzym und Substrat verbunden haben. Das Luciferase Assay System verwendet weiterhin, für eine verbesserte Kinetik, das Coenzym A (CoA), welches eine schnellere enyzmatische Umwandlung und damit eine verstärkte Lichtintensität und –produktion der Reaktion erlaubt, und daher ist das Reaktionsprodukt für nahezu eine Minute konstant. Unter optimalen Bedingungen reichen bereits 10^{-20} Mol der Luciferase aus, um eine sichtbare Reaktion herbeizuführen. Damit ist auch der Nachweis sehr geringer Mengen an Genaktivitäten bereits möglich.

Die Durchführung erfolgte wie folgt: für die in ihren 24-well Platten inkubierten und stimulierten Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit 500µl PBS Lösung gewaschen und anschließend mit 200µl des 5-fach verdünnten, mitgelieferten Luciferase Assay Reagenzes, Cell Culture Lysis Reagent (CCLR) lysiert. Nach 10 minütigem Schütteln und nachfolgendem Zentrifugieren waren die Probenlösungen für den eigentlichen Luciferase Assay vorbereitet.
Der Luciferase Assay wurde mit einem Luminometer der Berthold Detection Systems durchführt, indem in die dafür vorgesehenen Röhrchen eine Menge von 20µl der zu untersuchenden Proben blasenfrei pippetiert wurden. Ein vorgefertigtes Computerprogramm führte die notwendigen Schritte des Luciferase Assays durch, indem es in jedes Probenröhrchen 100µl des Luciferase Assay Reagenzes addierte und somit die Photoreaktion auslöste. Das Luminometer maß anschließend, für 10 Sekunden, die entstandene Quantität der Lichtreaktion und das Ergebnis des Luciferase Assays konnte daraufhin digital übertragen und per Datenverarbeitung grafisch dargestellt werden.

Statistische Auswertung:

Alle im Luciferase Assay ermittelten Werte wurden digital ausgewertet und zur Überprüfung des Wahrheitsgehaltes mit statistischen Tests belegt. Besondere Bedeutung hat dabei der in den Abbildungen in Abschnitt 3 verwendete p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit) der die größte untere Begrenzung (Infimum) des Signifikanzniveaus des verwendeten statistischen Tests darstellt. Es wurde ein Hypothesentest verwendet, wobei die H_1 Hypothese annimmt, dass die ermittelten Werte wahr und für den Versuch reproduzierbar und gültig sind. Die alternative H_0 Hypothese dagegen behauptet, dass alle im Versuch ermittelten Werte einer zufälligen Entstehung unterliegen und keine Aussage über die Ergebnisse des Versuchs zulassen. Der errechnete p-Wert gibt nun die Wahrscheinlichkeit in Prozent an mit der die H_0 Hypothese abzulehnen ist. Er wurde berechnet in dem der T-Test als Hypothesentest angewandt wird und hierbei einen Erwartungswert liefert. Mit Hilfe der Statistiksoftware SigmaStat konnte die für die im Luciferase Assay ermittelten Werte der zugehörige p-Wert angegeben werden.

2.8 α-Tubulin Ladekontrolle

Monoklonales anti α-Tubulin erkennt ein Epitop im Bereich des C-terminalen Endes des α-Tubulins des Menschen, welches ein wichtiger Baustein des Mikrotubulingerüstes einer jeden Zelle ist und in nahezu allen eukaryoten Zellen vorkommt. Mikrotubuline haben in der Zelle sowohl strukturelle Aufgaben im Zytoskelett, als auch dynamische Eigenschaften während der Mitose oder dem intrazellulären Transport. Dieses ubiquitäre Vorkommen des α-Tubulins prädestiniert es zu einem Ladekontrolltest, in dem bestimmt werden soll, ob in allen im Westernblot zum Vergleich aufgetragenen Proben, tatsächlich die gleiche Menge an Protein verwendet wurde und damit die Ergebnisse vergleichbar sind. Mit Hilfe des Pierce Restore™ Western Blot Stripping Buffer wurde die α-Tubulin Ladekontrolle nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, in dem die zuvor aufgetragenen „alten“ Antikörper entfernt wurden und daraufhin der Blot Ansatz neu geblockt wurde. Danach erst konnten die neuen beiden Antikörper zugegeben werden. Der erste Antikörper erkennt das α-Tubulin und wurde in einer Konzentration von 1:3000 (entspricht in diesem Versuch 3,75µl) aufgetragen und anschließend für 45 Minuten mit 10ml Blockpuffer gewippt. Als Zweitantikörper wurde ein Anti-Mouse IgG-1 HRP Antikörper verwand. Die Konzentration hierbei betrug 1:2000 (entspricht 5µl) und dieser wurde erneut für 45 Minuten bei Raumtemperatur gewippt, danach erfolgte ein erneutes Waschen und die zuvor beschriebene ECL Entwicklersequenz (siehe Abschnitt 2.5) zur Röntgenfilmdetektion und Sichtbarmachung der verwendeten Proteinmengen.

3. Ergebnisse

3.1 Hintergründe

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss verschiedener Transkriptionsfaktoren auf das Maß der Stimulierbarkeit der CRP Expression von HepG2 Zellen, als Modell für die Abläufe im menschlichen Organismus.
Um die Situation einer Entzündungsreaktion zu imitieren und um damit den Umstand einer vermehrten CRP Produktion zu induzieren, wurden die HepG2 - Zellen mit verschiedenen Varianten an humanen Interleukinen stimuliert, für 24 Stunden inkubiert und anschließend ausgewertet. Unstimulierte Zellen dienten dabei stets als Kontrolle. Die Konzentration von 10 ng/ml für das Stimulans wurde aus mehreren Vorversuchen ermittelt, die die Konzentration von 10 ng/ml Interleukin als minimale, stimulatorische Potenz ermittelten, also diejenige Konzentration, die mit dem vorgestellten Versuchsaufbau klar ersichtliche Ergebnisse liefern würde, falls sich der verwendete CRP Promotor stimulieren lassen würde. Für niedrigere Konzentrationen als 10 ng/ml Interleukin konnte keine eindeutige steigernde Wirkung der Zytokine auf den CRP Promotor und damit auch keine zweifelsfrei erfassbare Steigerung der CRP Synthese ausgemacht werden. Auf dieselbe Art und Weise wurde die Konzentration von 100 nM/ml für PDBu als geeignete Stimulansdosis ermittelt, das nur für die stabile Transfektion als Stimulans zum Einsatz kommt und noch einen zusätzlichen expressionssteigernden Effekt auf das neue Zellkulturmodell zeigt (siehe Abbildungen 12 und 13).

Ein weiterer Vorversuch war zur Klärung der Frage nach der Ausgangsaktivität von STAT3 Genen in den zu untersuchenden HepG2 Zellen nötig, da schon in den HepG2 Zellen bereits vorhandenes STAT3 das Transfektions- und Versuchsergebnis verfälschen würde. Zu diesem Zweck wurden zunächst frisch aufgetaute HepG2 Zellen kultiviert und in einem Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen das STAT3 Protein behandelt. Als Kontrolle für die korrekte Durchführung dieses Vorversuches dienten primäre humane Hepatozyten, die einen physiologischen STAT3 Anteil enthalten sollten. Außerdem wurden bei diesem Western Blot noch ABEK14 Zellen mit untersucht, bei denen

es sich um stabil transfizierte HepG2 Zellen handelt, die ein stabil transfiziertes CRP/ Promoterkonstrukt tragen und zur Markierung und Selektionierung der stabilen Transfektion mit dem Neomycin/ G418 Plasmid -Resistenzgen ausgestattet sind und von daher in der Erwartung auch keine Bande für STAT3 zeigen sollten.
Die Ergebnisse dieser Vorversuche sind in Abbildung 1 zusammengefasst. In der Anordnung von links nach rechts sind zunächst der Leiter, dann die humanen, primären Hepatozyten, die unbehandelten HepG2 Zellen und schließlich die ABEK14 Zellen aufgetragen.

Westernbolt gegen STAT3:

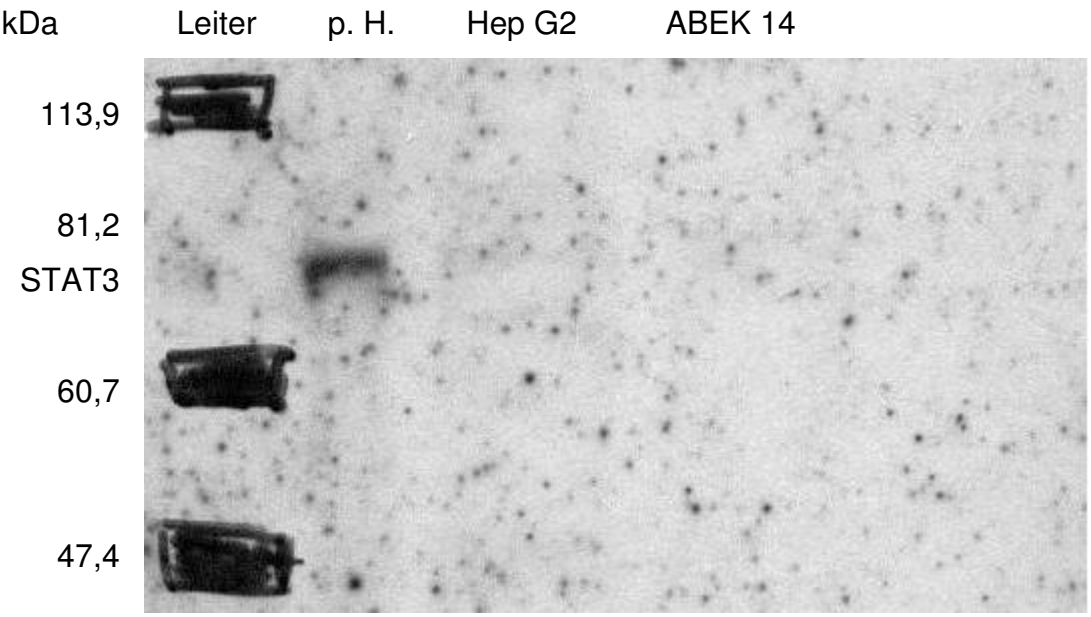


Abbildung 1: gezeigt ist ein vorbereitender Western Blot gegen humanes STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) für primäre Hepatozyten (p.H.), Hep G2 (Hepatom G2) Zellen und ABEK 14 (Eigenname) Zellen um die Ausgangssekretion für das zu untersuchende CRP (C- reaktive Protein) zu bestimmen

Das vorliegende Bild bestätigt die oben genannten Erwartungen. STAT3 ist mit Hilfe des spezifischen Antikörpers gegen humanes STAT3 nur in primären humanen Hepatozyten (p.H.) nachweisbar und zeigt eine deutliche dunkle Bande an der erwarteten Stelle. Für HepG2 Zellen ist kein STAT3 nachweisbar, es konnte also gezeigt werden, dass in HepG2 Zellen keine Proteinsynthese für STAT3 vorliegt. Auch für die ABEK14 Zellen konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass sie keinerlei STAT3 Eigenproduktion aufweisen. Für diesen Vorversuch ist keine α –Tubulinladekontrolle erfolgt, allerdings erfolgte vor Auftragen der Proteinmengen auf die Western Blot Membran eine Proteinbestimmung, so dass gewährleistet war, dass in allen 3 Probenlauftaschen der Western Blot Membran die gleiche Menge an eingesetztem Protein aufgetragen war.
In der weiteren Überlegung ist nun eine erfolgreiche Transfektion von STAT3 Gen mit diesem Versuchsaufbau sehr gut kontrollierbar, da eine, bei erfolgreich transfizierten HepG2 Zellen, auftretende positive Bande in diesem Western Blot ausschließlich auf die transfizierte Geninformation und der daraus resultierenden Proteinbiosynthese beruhen kann.

3.2 Transiente Transfektionen

Um die Fragestellung des Einflusses des JAK/ STAT Pathways auf die CRP Expression in HepG2 Zellen zu klären wurden zunächst transiente Transfektionen an diesen Zellen durchgeführt. Die Transfektion erfolgte mit 1 µg DNA, das sich zusammensetzte aus 0,5 µg des -1000bp CRP/ Luc Promotorkonstruktes sowie aus 0,5 µg des jeweiligen STATs (verwendet wurden STAT 1 bis 6) bzw. 0,5 µg des PGL basic Leervektors, der als Kontrolle keinen Promotor enthält. Jedes well erhielt 1 ml Standardmedium. Die Transfektion erfolgte mit 2,5 µg Lipofectamine™ 2000. Die Versuche wurden alle immer in Dreifachbestimmung durchgeführt und aus allen erhaltenen Ergebnissen wurde anschließend das arithmetische Mittel (Durchschnitt) errechnet. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit den Interleukinen stimuliert. Die Zugaben waren wie folgt: 10 ng/ml für IL -1, die Kombination aus 10 ng/ml IL -1 + 10 ng/ml IL -6, sowie die Variante keiner Stimulation (NT = not treated). Nach dreimaliger Durchführung eines jeden

Experiments wurden, für jede Stimulation aus neun erhaltenen Werten, der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt und das Ergebnis in einem Säulendiagramm aufgetragen (siehe Abbildungen 2 bis 6). Die Ausgangsaktivität an Luciferaseaktivität ist dabei mit dem Stimulationsfaktor Wert = 1 für den PGL basic Vektor, ohne Stimulation, festgesetzt. Alle anderen Werte beziehen sich demnach im berechneten Verhältnis auf diesen Wert, zur besseren Vergleichbarkeit und Übersicht der Aktivitätsmaße. Der Stimulationsfaktor ist auf der Y– Achse aufgetragen. Jedes Säulendiagramm erhält zusätzlich einen Fehlerindikator in Form der Standardabweichung, auch mittlerer Fehler oder RMS error (root mean square) genannt.

Die Austestung für die verschiedenen STATs erfolgte unter den exakt gleichen Versuchsbedingungen und ergab für die einzelnen Stimulationen folgende Werte (Abbildungen 2 bis 6):

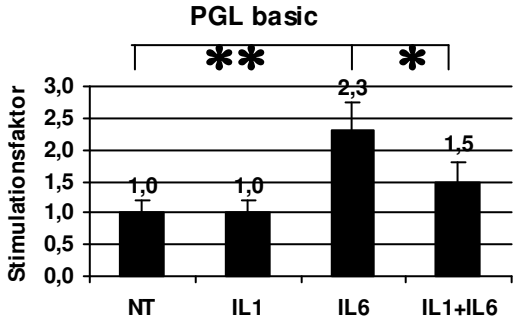


Abbildung 2: Ergebnisse der Stimulationen mit den Interleukinen (IL) 1 und 6 im Luciferase Assay nach transienter Transfektion mit den PGL basic Leervektor. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen der Versuche mit Ihren Standardabweichungen.
NT = not treated (unbehandelt)

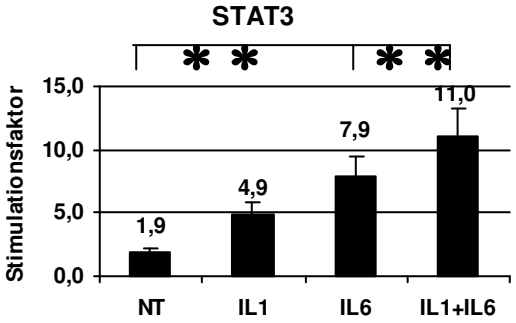


Abbildung 3: Ergebnisse der Stimulationen mit den Interleukinen (IL) 1 und 6 im Luciferase Assay nach transienter Transfektion mit dem Transkriptionsfaktor STAT3 (signal transducer and activator of transcription).
Die angegebenen Werte sind Mittelwerte mit Ihren Standardabweichungen.
NT = not treated (unbehandelt)

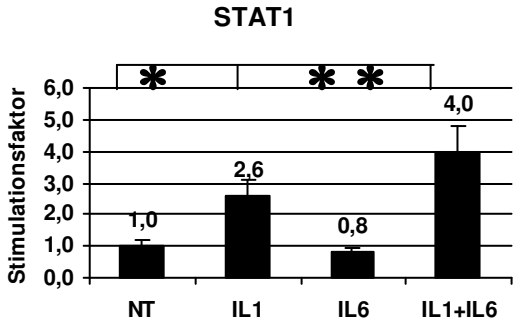


Abbildung 4: Ergebnisse der Stimulationen mit den Interleukinen (IL) 1 und 6 im Luciferase Assay nach transienter Transfektion mit dem Transkriptionsfaktor STAT1 (signal transducer and activator of transcription)

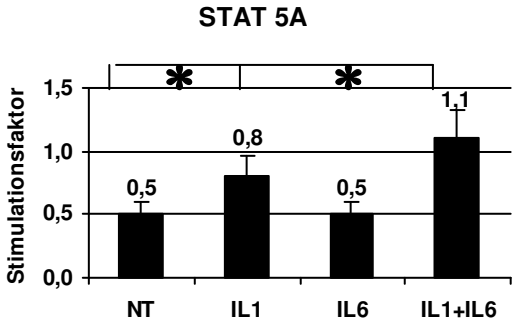


Abbildung 5: Ergebnisse der Stimulationen mit den Interleukinen (IL) 1 und 6 im Luciferase Assay nach transienter Transfektion mit dem Transkriptionsfaktor STAT5A (signal transducer and activator of transcription)

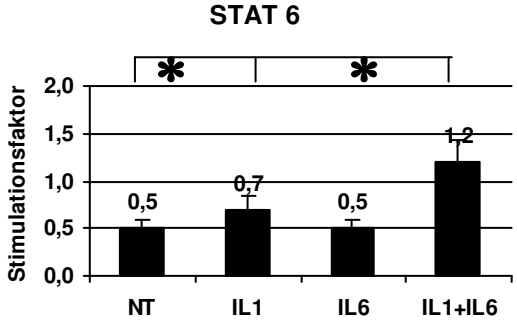


Abbildung 6: Ergebnisse der Stimulationen mit den Interleukinen (IL) 1 und 6 im Luciferase Assay nach transienter Transfektion mit dem Transkriptionsfaktor STAT6 (signal transducer and activator of transcription)

Bei den gezeigten Abbildungen (2 -6) sind die angegebenen Werte Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen der Versuche mit Ihren Standardabweichungen.
NT steht für „not treated“ (unbehandelt)

✱ ✱ steht für doppelt signifikante Werte ($p < 0,01$)

✱ steht für einfach signifikante Werte ($p < 0,05$)

Zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit ist im Folgenden ein Übersichtsergebnisdiagramm mit allen STATs und ihren Stimulationen, auf einen Blick, gegenübergestellt. Daraus wird das Verhältnis der einzelnen STATs in ihrer Stimulierbarkeit zueinander deutlich (Abbildung 7):

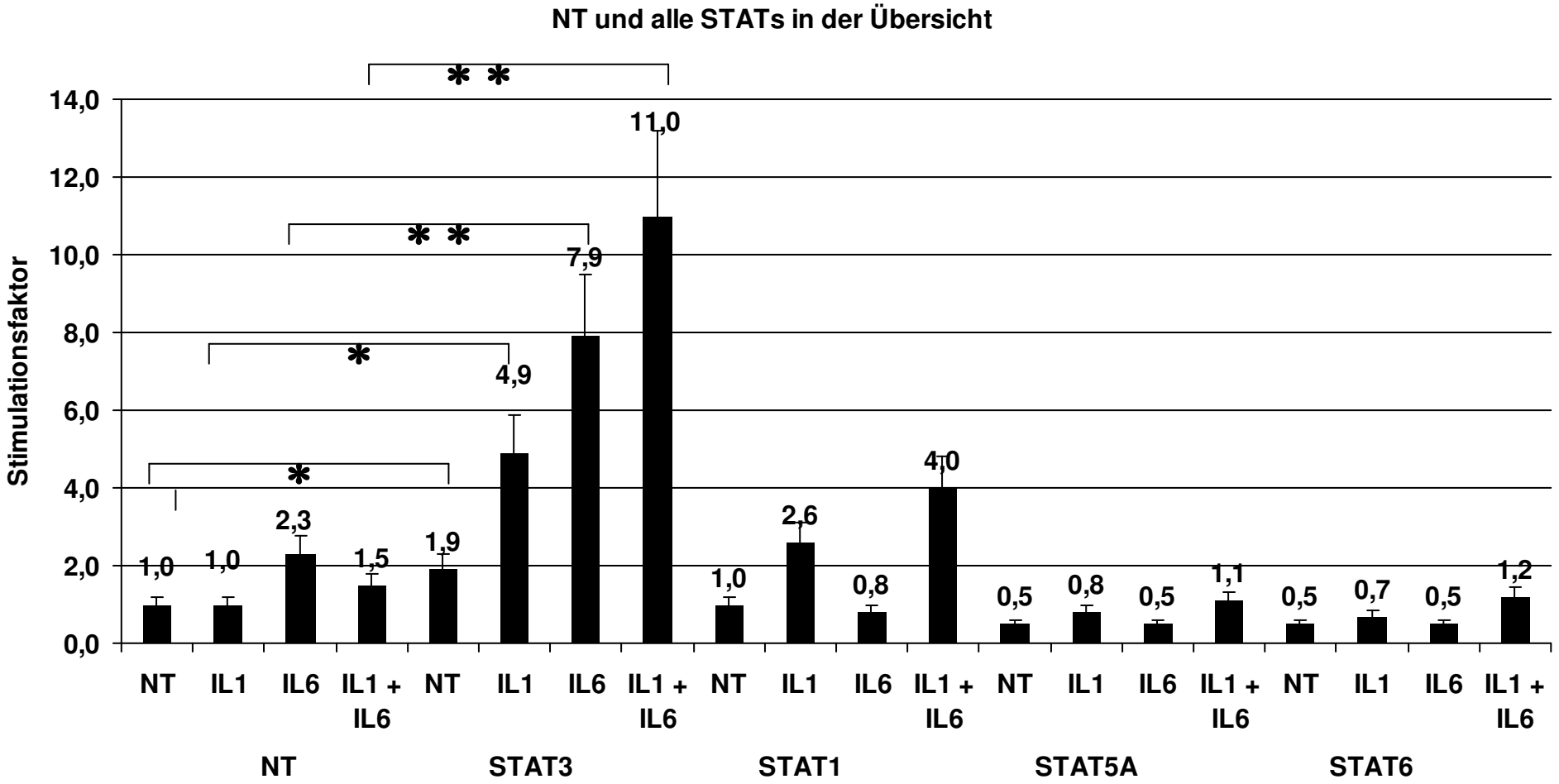


Abbildung 7: Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse der Stimulationen mit den Interleukinen (IL) 1 und 6 im Luciferase Assay nach transienter Transfektion mit dem Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3, STAT5A, STAT6 (signal transducer and activator of transcription). NT = not treated (steht unten für keinen Transkriptionsfaktor und darüber für keine Stimulation mit IL1/ 6)

In Abbildung 7 erkennt man bereits an den unstimulierten Zellen, dass die transfizierten HepG2 Zellen schon eine basale Expression an CRP zeigen, die durch Zugabe der verwendeten Stimulantien deutlich zu steigern war. Interleukin 6 allein, hat die größte Potenz die CRP Basisexpression um bis zu einem Faktor von 2,3 zu steigern, hierbei noch ohne Einfluss der zu untersuchenden STATs.

Im Vergleich der Diagramme unter Einfluss der verwendeten STATs ergaben sich zusätzliche deutliche Unterschiede. Die Versuche zeigen den stärksten Anstieg der Luciferaseaktivität für STAT3. Für STAT3 ist schon in der unstimulierten Ausgangsprobe ein Anstieg der CRP Promotorexpression um den Faktor 1,9 ± 0,7 festzustellen. Während IL -1 in Kombination mit dem PGL basic Leervektor keine stimulierende Wirkung zeigt, steigert STAT3 in Verbindung mit IL -1β die CRP Aktivität um den Faktor 4,9 ± 1,2. Für IL -6 ist ein 7,9 ± 1,8 -facher Anstieg auszumachen und am stärksten reagiert der CRP Promotor auf die gleichzeitige Kombination von IL -1 und IL -6, mit einem Anstieg der CRP Expression auf den 11 ± 2,6 –fachen Ausgangswert bzw. auf einen 7,5 -fachen Wert im Vergleich zum PGL basic Leervektor. STAT3 zeigte bei diesen Versuchen den größten steigernden Einfluss auf den CRP Promotor während STAT1 einen hauptsächlichen Effekt in Bezug auf das IL -1 zu haben scheint. Für die Versuche mit STAT5a und STAT6 sind keine bis möglicherweise inhibitorische Effekte auf die CRP Expression ausmachen. Sie erreichen beim unstimulierten Versuchsaufbau nur die Hälfte der CRP Expressionsaktivität, im Vergleich zur unbehandelten Probe und erreichen bei Stimulation mit beiden Zytokinen gerade mal den Ausgangswert des PGL basic Vektors.

Aus der Versuchsreihe mit den transienten Transfektionen lässt sich somit schließen, dass das STAT3 den stärksten Einfluss auf eine Steigerung der CRP Genexpression hat. Dieses Ergebnis legte den Wunsch nahe eine stabil transfizierte Zellreihe zu erstellen, welche die genetische Information für das CRP/ Luc Promotorkonstrukt und für STAT3 ständig trägt, passagierbar ist und in ihrer Genexpression konstant bleibt. Mit diesem Zellkulturmodell wäre eine Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Interleukine auf die CRP Promoteraktivität mit und ohne STAT3 möglich. Weiterhin könnte ein solches Zellkulturmodell zur Identifizierung von pharmakologischen Inhibitoren der CRP Expression hilfreich sein, eine Überlegung,

die möglicherweise als Fernziel therapeutischen Nutzens zur Eingrenzung der Atherosklerose und zur Reduzierung kardiovaskulärer Ereignisse mit sich bringen könnte.

Da der Ansatz zur erneuten stabilen Transfektion der ABEK14 Zellen (siehe Abschnitt 2.6), sowie ein weiterer Ansatz, mit dem Versuch alle drei Plasmide stabil zu transfizieren, nur stets für maximal zwei Plasmide einen Transfektionserfolg zeigte, erfolgte die Klonierung des STAT3 Vektors in das Neomycin Plasmid (pcDNA 3.1) wie in Abschnitt 2.6 beschrieben. Neomycin hat sich zudem als das bessere Markierungs- und Selektionsantibiotikum gegenüber den anderen verwendeten Antibiotika erwiesen, konnte aber bei einer erneuten Transfektion mit den ABEK14 Zellen nicht verwendet werden, da diese mit Neomycin bereits selektioniert worden waren und somit das Plasmid für Neomycin bereits in ihrem Genom tragen. Nach erfolgreichem Durchführen des Klonierungsteilschrittes (Abschnitt 2.6), sowie nach Ausführen des Minipreps, erfolgte ein Kontrollverdau mit den spezifischen Restriktionsenzymen, die genau den Neomycinvektor bzw. das STAT3 aus dem neuen Plasmid herausschneiden sollten. Dieser Schritt ist nötig um die Positivität des Einbaus der beiden neuen Geninformationen von STAT3 und Neomycin in dem neu klonierten Vektor zu verifizieren und etwaige Fragmentmutationen in der Amplifikation des Vektors zu erkennen. Punktmutationen oder einzelne Basenaustausche sind mit dieser Untersuchung nicht zu erkennen und wären nur in einer Gensequenzanalyse sichtbar zu machen.

In Abbildung 8 sind die DNA Fragmente diesen Kontrollverdaus auf Agarosegel aufgetragen und nach einem Ethidiumbromidbad unter UV -Licht abfotografiert.

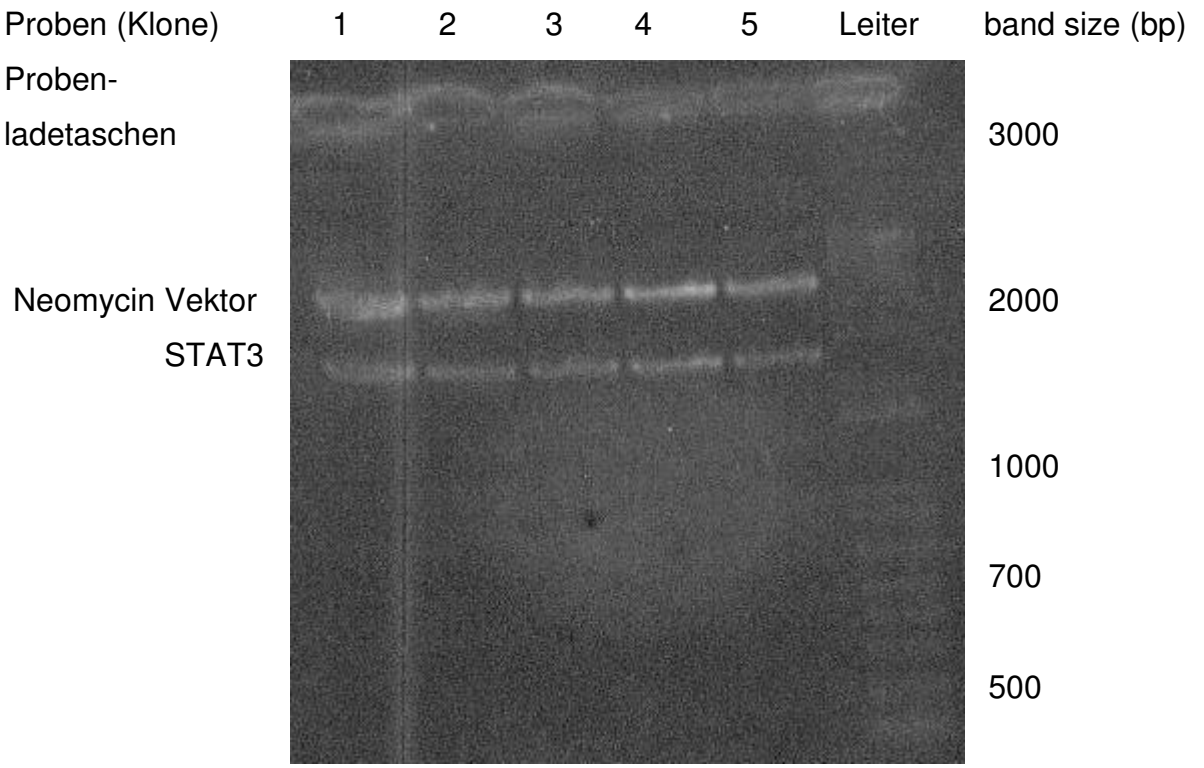


Abbildung 8: Zeigt den Kontrollverdau mit den passenden Restriktionsenzymen Pme I und Sac I (Eigennamen des Herstellers) zur Erfolgskontrolle des neu klonierten STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3)/ Neomycinvektors nach durchgeführtem Miniprep

Die UV Abbildung des Gellaufs (Abbildung 8 für den Verdau des STAT3/ Neomycin Vektors nach dem Miniprep) zeigt die erwarteten beiden Gensegemente getrennt in zwei Banden in allen fünf erstellten und replizierten Klonen und somit das Vorhandensein der beiden Geninformationen für STAT3 und Neomycin in dem neu klonierten pcDNA 3.1 STAT3/ Neomycin Vektor, der für die nun folgende stabile Transfektion Verwendung finden sollte. Zur Isolierung der neu gewonnen, stabil transfizierten Klone soll die in Abschnitt 2.6 beschriebene Antibiotikaselektion Verwendung finden. Zunächst galt es dabei eine geeignete Antibiotikakonzentration für die Zelllinien zu finden, die dem Grad der transfizierten Antibiotikaresistenz gerecht werden, aber dennoch zuverlässig die nicht erfolgreich stabil transfizierten Zellen eines jeden Ansatzes eleminieren.

Durch den Versuchsaufbau mit einer aufsteigenden Neomycin Konzentration von 200 µg/ml bis 2000 µg/ml in der Zellkultur über sieben Tage für eine 24 well Platte mit unbehandelten HepG2 Zellen und jeweils ca. 200 000 Zellen/ well, wurde eine Neomycin Toxizitätskurve ermittelt, die als Ergebnis die minimal toxische Konzentration für eine optimale Selektion von erfolgreich transfizierten HepG2 Zellen liefert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zur Vitalität der HepG2 Zellen unter en ansteigenden Neomycin Konzentrationen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Versuch zur Vitalität von HepG2 Zellen bei ansteigenden Neomycin Konzentrationen

Neomycin	200 µg/ml	600 µg/ml	800 µg/ml	1000 µg/ml	1200 µg/ml	1500 µg/ml	2000 µg/ml
nach 2d	+++	+++	++	++	+	-	-
nach 3d	+++	++	++	+	-	-	-
nach 4d	+++	++	+	+	-	-	-
nach 7d	+++	++	+	-	-	-	-

Tabelle 9: Ergebnisse der erstellten Toxizitätskurve mit steigenden Konzentrationen des Antibiotikums Neomycin in Zellkultur für die HepG2 Zellen

+++ bedeutet: Neomycin hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der HepG2 Zellen
++ bedeutet: mäßiger Einfluss des Neomycins auf die Vitalität der HepG2 Zellen
+ bedeutet: starker Einfluss des Neomycins auf die Vitalität der HepG2 Zellen
- bedeutet: toxische Wirkung des Neomycins auf die HepG2 Zellen

Zur Ermittlung der minimal toxischen Konzentration wurden die HepG2 Zellen verschiedenen Konzentrationen von Neomycin zwischen 200 µg/ml bis 2000 µg/ml über sieben Tage ausgesetzt.

Unter einer minimal toxischen Konzentration wird der Wert verstanden, bei dessen Antibiotikakonzentration in der Zellkultur alle Zellen innerhalb von sieben Tagen abgestorben waren.

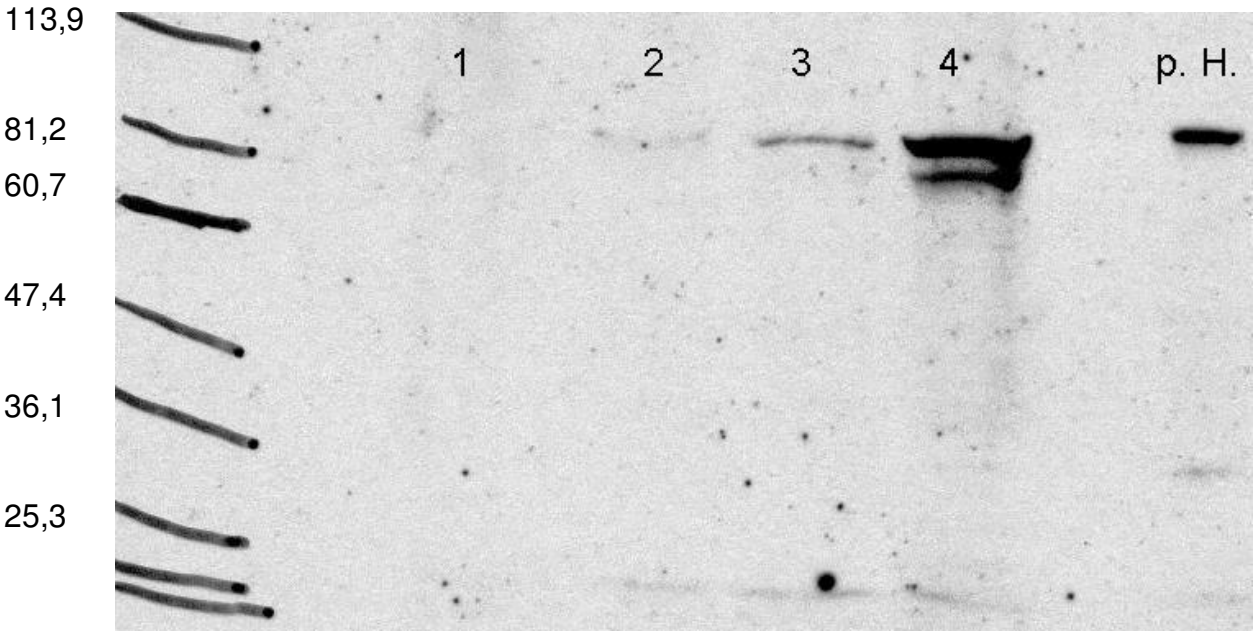
3.3 Stabile Transfektion

Mit dem in Abschnitt 2.6 beschriebenen neu klonierten STAT3/ Neomycin Vektor war es nun möglich die stabile Transfektion erneut zu versuchen (nach Austestung der minimal toxischen Neomycinkonzentration mittels einer Neomycin Toxizitätskurve und Optimierung der Transfektionsbedingungen mittels eines β -Gal Tests), da nun nur noch zwei Plasmide in die HepG2 Zellen stabil einzubringen waren und dieser Vorgang war, wie bereits beschrieben, in Vorversuchen vormals bereits mehrfach gelungen war.

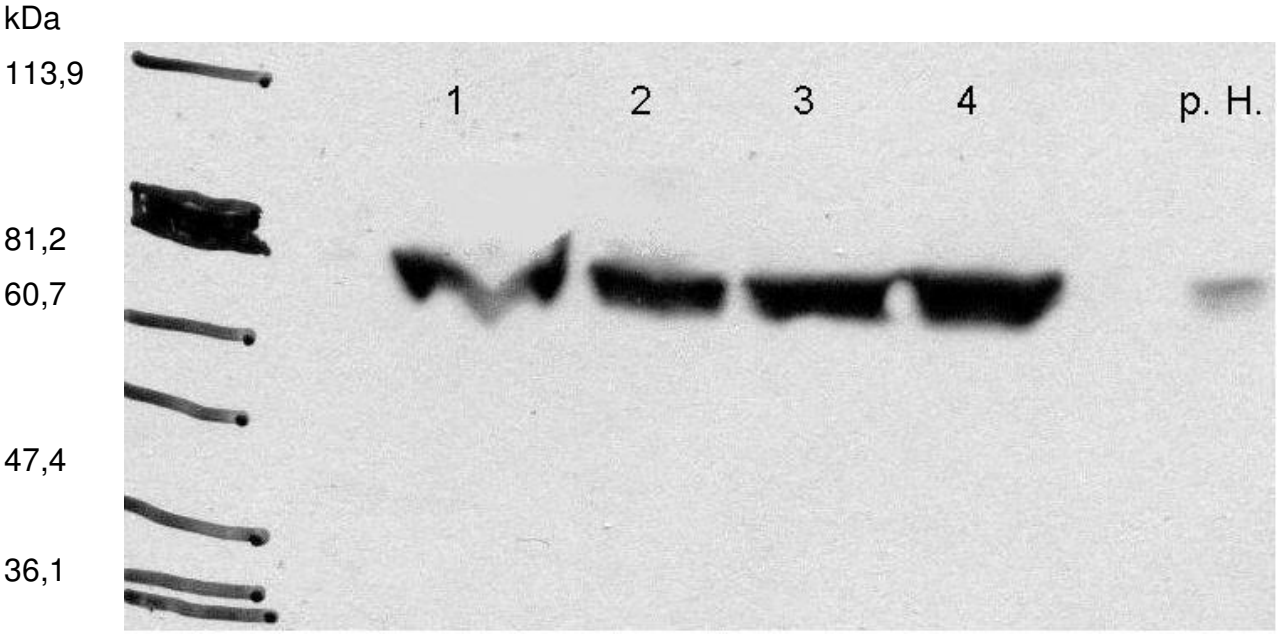
Nach erfolgreicher stabiler Transfektion der HepG2 Zellen wie ebenfalls in Abschnitt 2.6 beschrieben, wurden nach 20 Tagen vier Klone gepickt, separat auf 24 well Platten überführt, hinreichend expandiert und es erfolgte zur Kontrolle des Transfektionsergebnisses der Zellen ein Westernblot, mit dem Ziel des eindeutigen Proteinnachweises von STAT3. Zur Detektion der STAT3 Expression wurde der Western Blot wie in Abschnitt 2.5 beschrieben durchgeführt und es wurde der spezifisch gegen humanes STAT3 gerichtete Erstantikörper zum Nachweis der STAT3 Geninformation verwendet. Erneut haben wir primäre humane Hepatozyten zusätzlich aufgetragen, die wiederum als Kontrolle für die korrekte Durchführung des Versuchsaufbaus dienten.

Es zeigte sich für die Proben 1 bis 4, sowie für die zum Vergleich aufgetragenen primären Hepatozyten (p.H.) folgendes Ergebnis des Westernblots (Abbildung 9) und der im Anschluss durchgeführten α –Tubulin Ladekontrolle (siehe Abbildung 10):

kDa Western Blot der Klone 1 bis 4, sowie primärer Hepatozyten (p.H.)



kDa



oben Abbildung 9: Westernblot gegen STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) nach stabiler Transfektion von HepG2 Zellen für die erhaltenen positiven Klone 1 bis 4 und mit primären Hepatozyten als Positivkontrolle

unten Abbildung 10: α –Tubulin Ladekontrolle für den STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) Westernblot aus Abbildung 9 nach stabiler Transfektion von HepG2 Zellen für die positiven Klone 1 bis 4 und für primäre Hepatozyten

Im Vergleich der vier im Western Blot in Abbildung 9 getesteten Klone der stabilen Transfektion zeigte sich für den Klon mit der Nummer 4 die deutlichste und dickste Bande an der erwarteten Stelle für STAT3. Zur Kontrolle wurden erneut primäre humane Hepatozyten aufgetragen, die ebenfalls eine Bande mit dem STAT3 Antikörper in der zu erwartenden Höhe zeigen. Damit konnte das Ergebnis einer erfolgreichen stabilen Transfektion für STAT3 in die HepG2 Zellen gezeigt werden.

Um im Western Blot aus Abbildung 9 eine vergleichbare Aussage über die Bandenstärke und damit indirekt auch über den Grad an Proteingehalt an STAT3 in den stabil transfizierten HepG2 Zellen, im Vergleich zu den unbehandelten primären Hepatozyten machen zu können, wurde zunächst vor dem Auftragen der Lysatmengen des Western Blots, eine Proteinbestimmung durchgeführt, um gleiche Mengen Protein für alle sechs Kammern aufzutragen. Zusätzlich wurde nach dem Western Blot noch eine α –Tubulin Ladekontrolle durchgeführt um zu zeigen, dass bei allen sechs gelaufenen Proben dieselben Mengen an Protein aufgetragen wurden und damit eine quantitative Aussage über die produzierte Menge an STAT3 Protein in dem neu erstellten, stabil transfizierten Zellkulturmodell möglich ist.
Die α –Tubulin Ladekontrolle wurde wie in Abschnitt 2.8 beschrieben durchgeführt. Das Ergebnis für die Proben 1 bis 4 und für die primären Hepatozyten (p.H.) ist in Abbildung 10 dargestellt.

Die stabile Transfektion mit den in die HepG2 Zellen eingebrachten Vektoren für STAT3 und den CRP Promotor mit Luciferaseaktivität wurde wie in Abschnitt 2.6 beschrieben durchgeführt und anschließend mit den Interleukinen IL -1, IL -6, PDBu, sowie mit der gleichzeitigen Kombination von IL -1, IL -6 und der Kombination aller drei Stimulantien, IL -1,IL -6, PDBu getestet.

Als Ergebnis der Stimulierbarkeit für das neue Zellkulturmodell zeigt sich Abbildung 11:

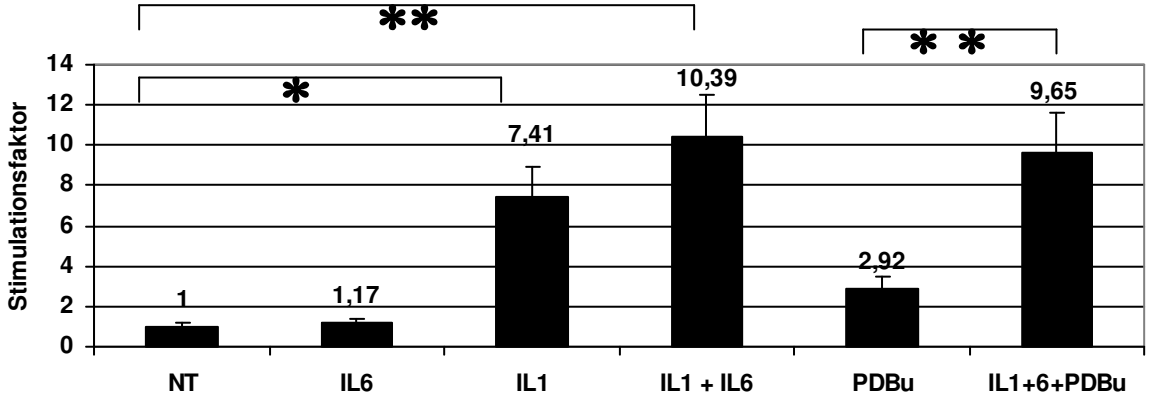


Abbildung 11: Übersichtsdiagramm zur Stimulierbarkeit der HepG2 Zellen nach stabiler Transfektion mit STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) und dem -1000bp CRP Promotorkonstrukt. Stimulation mit den Interleukinen (IL) 1, 6 und dem PKC Pathway Aktivator PDBu (4α-Phorbol 12,13-Dibutyrat). Alle Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen der Versuche mit Ihren Standardabweichungen. NT steht für „not treated“ (unbehandelt)

* * steht für doppelt signifikante Werte ($p < 0,01$)

* steht für einfach signifikante Werte ($p < 0,05$)

Erneut wurde das Maß der CRP Produktion rechnerisch in ein Verhältnis zur unstimulierten Probe (NT) mit der stabil transfizierten Zellreihe gesetzt. Alle Ergebnisse sind Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung der Versuchsreihen, ausgegeben mit ihren Standardabweichungen als Fehlerindikator.

Hierbei zeigte sich ein noch deutlicheres Bild des Ansprechens auf die Stimulantien als im Versuch mit der transienten Transfektion des CRP Promotorkonstruktes. Die Luciferase Aktivität stieg auf eine IL -6 Stimulation hin um den Faktor 1,17, auf einen IL -1 Reiz hin sogar um Faktor 7,41 ± 0,96. Mit der gleichzeitigen Kombination von IL -1 und IL -6 Anstieg auf den Faktor 10,39 ± 0,88, mit PDBu auf 2,92 ± 0,19 und auf die Dreierkombination mit IL -1, IL -6 und PDBu auf den Faktor 9,65 ± 0,73.

Die Sicherstellung der Integrität des STAT3 Gens in die HepG2 Zellen wurde hierbei doppelt verifiziert. Erstens mit einer PCR zum Nachweis der DNA Abschnitte in dem neuen Zellkulturmodell und zweitens zusätzlich mit einem Westernblot zum direkten Proteinnachweis, also als Synthesenachweis des STAT3 Proteins in den neuen Zellen. Dieser wurde zusätzlich mit einer erneuten α –Tubulin Ladekontrolle auf seine Vergleichsfähigkeit hin überprüft.
Auf diese Art und Weise konnte sicher gezeigt werden, dass die aufgezeigten Effekte auf der Anwesenheit des STAT3 Gens in den neu stabil transfizierten Hep G2 Zellen beruhen. Die Anwesenheit des CRP Promotorkonstruktes ist herbei ebenfalls durch eine Reaktion im Luciferase Assay System bewiesen.

Die Ergebnisse zeigen erneut den maßgeblichen Einfluss der Zytokine IL -1 und IL -6 auf die CRP Promotoraktivität. Der bei diesen Versuchen zusätzlich verwendete PKC Aktivator PDBu steigert die CRP Expression um den Faktor 10,9 ± 0,2 und erreicht dabei allein nicht die Potenz, die die beiden Interleukine in Kombination aufbringen. Allerdings erreicht die Kombination aller drei Stimulantien nochmals einen deutlichen Anstieg der CRP Expression über die erwarteten Maße hinaus. Die Kombination der beiden unterschiedlichen Ansatzpunkte zur Stimulation, aus Einfluss der Interleukine und der Aktivierung des PKC Pathways, erreicht offensichtlich in Kombination einen nochmals deutlichen Anstieg der CRP Promotoraktivität auf das 4,6 -fache der stimulatorischen Potenz der Interleukine allein.

Um nun eine Aussage darüber treffen zu können, inwieweit der Einfluss des STAT3 direkt auf die CRP Promotorexpression steigernd wirkt, ist noch folgender Versuch abschließend an die bisher beschriebenen Versuchsreihen angeschlossen worden. Durch eine direkte Gegenüberstellung der ABEK 14 Zellen mit den STAT3 Zellen, ist ein direkter Vergleich der beiden Zelllinien in Hinblick auf ihre Stimulierbarkeit des CRP Promotors möglich. Beide Zelllinien tragen dabei stabile Transfektionen für das CRP –Luciferasepromotorkonstrukt, sowie für die G418 (Neomycin) Antibiotikaresistenz. Beide Zelllinien sind mit den gleichen Labormaterialien und mit denselben Techniken entstanden.
Die neue STAT3 Zelllinie unterscheidet sich demnach von den ABEK14 Zellen lediglich durch die Umklonierung des STAT3 Vektors in das Neomycin Plasmid (pcDNA 3.1) wie in Abschnitt 2.6 beschrieben. Mit diesem Versuchsaufbau ist

demnach über einen direkten Vergleich der beiden Zelllinien eine Aussage über den Einfluss des STAT3 auf die CRP Promotoraktivität und damit auf die CRP Genexpression möglich.

Beide Zellreihen sind unter exakt denselben Bedingungen und über die gleichen Zeiten stimuliert worden. Der Versuch wurde erneut stets in Dreifachbestimmung durchgeführt. 24 Stunden nach der Zellaussaat wurden die Zellen mit den besagten Interleukinen stimuliert. Mit 10 ng/ml für IL- 1, 10 ng/ml für IL -6, der Kombination aus 10 ng/ml IL -1 + 10 ng/ml IL -6, sowie der Variante keine Stimulation (NT = not treated). Nach dreimaliger Durchführung eines jeden Versuchs wurde für jede Stimulation aus den neun erhaltenen Werten der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt und das Ergebnis im folgenden Säulendiagramm aufgetragen (siehe Abbildung 12 für die stabile STAT3 Transfektion und Abbildung 13 für die ABEK 14 Zellen). Die Ausgangsaktivität der Luciferaseaktivität ist dabei mit dem Stimulationsfaktor Wert = 1 für die Ausgangsaktivität der ABEK14 Zellen berechnet und damit als Ausgangswert ohne Stimulation festgesetzt. Alle anderen Werte beziehen sich in einem berechneten Verhältnis auf diesen Wert, wodurch eine bessere Vergleichbarkeit der Aktivitätsmaße ermöglicht wird. Der Stimulationsfaktor ist auf der Y –Achse aufgetragen. Jedes Säulendiagramm erhält zusätzlich einen Fehlerindikator in Form der Standardabweichung, auch mittlerer Fehler oder RMS error (root mean square) genannt.

Gegenüberstellung der Säulendiagramme zur Stimulierbarkeit der CRP Promotoraktivität der ABEK14 und der stabil transfizierten STAT3 Zellen:

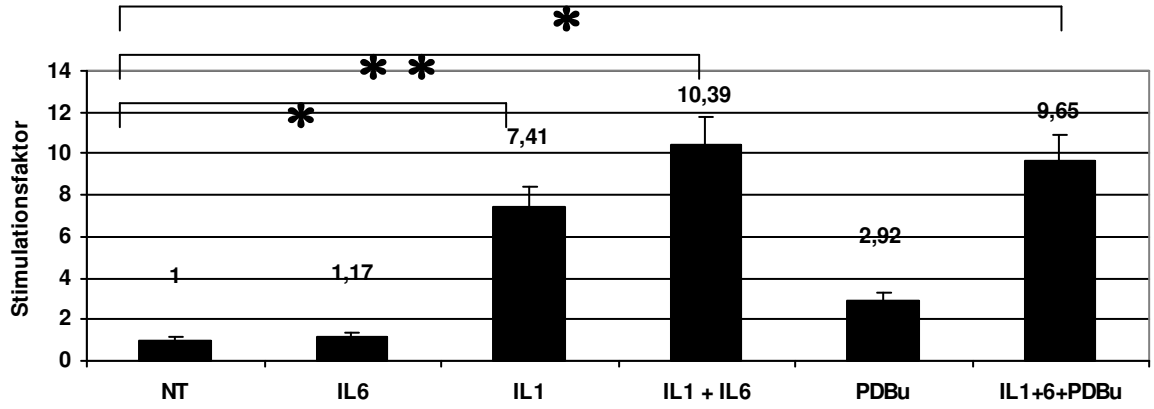


Abbildung 12: Übersichtsdiagramm zur Stimulierbarkeit der HepG2 Zellen nach stabiler Transfektion mit STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) und dem -1000bp CRP Promotorkonstrukt. Stimulation mit den Interleukinen (IL) 1, 6 und dem PKC Pathway Aktivator PDBu (4α-Phorbol 12,13-Dibutyrat) zur direkten Gegenüberstellung mit der ABEK14 (Eigenname) Zellkultur (enhalten kein STAT3)

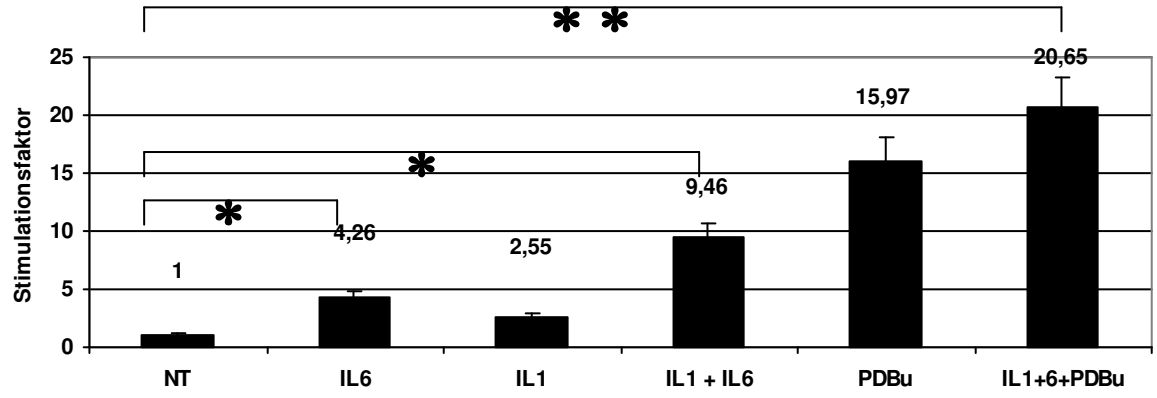


Abbildung 13: Übersichtsdiagramm zur Stimulierbarkeit der HepG2 Zellen nach stabiler Transfektion mit dem -1000bp CRP Promotorkonstrukt (sog. ABEK14 Zellen), diese enthalten kein STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3). Stimulation mit den Interleukinen (IL) 1, 6 und dem PKC Pathway Aktivator PDBu (4α-Phorbol 12,13-Dibutyrat) zur direkten Gegenüberstellung mit den STAT3 Zellen Alle Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung

✱ ✱ steht für doppelt signifikante Werte ($p < 0,01$)

✱ steht für einfach signifikante Werte ($p < 0,05$)

Bei einer direkten Gegenüberstellung der absolut ermittelten Stimulationswerte dieses Versuchs zeigt sich, dass die mit dem STAT3 Vektor zusätzlich stabil transfizierten Zellen, unbehandelt und ohne Interleukine, bereits eine um den Faktor 11,9 ± 1,2 –fach höhere CRP Promotoraktivität aufweisen als die Zellen ohne STAT3. Diese Aussage ist allerdings nur sehr eingeschränkt verwertbar, da trotz der vollständig identischen Versuchsbedingungen für beide Zellreihen keine Aussage über die Zahl der stabil transfizierten Plasmide in die Zellen und damit über den Grad der unstimulierten Promotoraktivität direkt gemacht werden kann. Es bleibt somit nur die Möglichkeit der Gegenüberstellung der beiden Diagramme, wie in Abbildung 12 und Abbildung 13 gezeigt. Dabei fallen Unterschiede in der Stimulierbarkeit der unbehandelten Zellen auf, sowie im Antwortverhalten der Kulturen auf die verwendeten Interleukine bezüglich ihrer Expressionraten.
Deutliche Unterschiede gibt es für die Stimulierbarkeit mit IL -1β. Hierbei ist das Verhältnis 2,55 ± 0,2 –fach der ABEK14 Zellen zu Faktor 7,41 ± 0,5 bei den STAT3 Zellen und somit in der Schlußfolgerung für die zusätzlich mit STAT3 stabil transfizierten Zellen um den Faktor 2,91 ± 0,3 höher. STAT3 scheint also einen signifikanten Einfluss auf den Zytokinsignalweg von IL -1β zu haben.
Im Gegensatz dazu ist das Ausmaß der Stimulation für das in diesem Versuchsaufbau zusätzlich angewandte PDBu für die ABEK14 Zellen deutlicher. Diese scheinen mehr auf den Proteinkinase C Pathway anzusprechen, bei einem Unterschied von Faktor 5,5 ± 0,3.

Bei der Zugabe von IL -6 bewirkt die stabile STAT3 Transfektion keine Steigerung der CRP Expression, hier lassen sich ebenfalls die ABEK14 Zellen um den Faktor 3,6 ± 0,2 höher gegenüber der STAT3 Zellen stimulieren. Für die Kombination von IL -1 und IL -6 lässt sich die STAT3 Zelllinie ungefähr gleichwertig zu den ABEK14 Zellen stimulieren und für die Kombination aller drei Stimulantien aus IL -1, IL -6 und PDBu zeigen erneut die ABEK14 Zellen ein höheres Ansprechen, was auf eventuell auf die bereits erwähnte und zuvor gezeigte größere Stimulierbarkeit des Proteinkinase C Pathways zurückzuführen sein könnte.

Als Ergebnis bleibt also eine feststellbare Steigerbarkeit der CRP Promotoraktivität durch die zusätzliche stabile Transfektion von STAT3 speziell für das Interleukin IL -1β um den 2,5 ± 0,3 –fachen Wert, bei Gegenüberstellung mit der vergleichbaren Zelllinie ABEK14, die diesen Transkriptionsfaktor nicht trägt. Was im Einzelnen zu dieser Steigerung führt oder was die maßgebliche Rolle des STAT3 bei der CRP Genexpression im Zusammenhang mit IL -1β ist, konnte mit diesem Versuchsaufbau nicht geklärt werden.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die mögliche Bedeutung des Einflusses von Transkriptonsfaktoren des JAK/ STAT Pathways und von Interleukinen auf die CRP Expression in humanen HepG2 Zellen in vitro untersucht und damit ihre mögliche Bedeutung für die Atherogenese aufgezeigt. Beschrieben wurde der Einfluss von verschiedenen Interleukinen und Transkriptionsfaktoren auf die Regulation der CRP Biosynthese in HepG2 Zellen, als Modell für den Ablauf der CRP Proteinbiosynthese in primären humanen Hepatozyten. Durch Stimulation der HepG2 Zellen konnte eine Dosis -Antwort Kurve für verschiedene getestete STATs sowie weiterhin für die verwendeten Stimulantien an Interleukinen und eines PKC Aktivators erarbeitet und untersucht werden.

In den westlichen Industrienationen ist die Atherosklerose mit ihren Folgeerkrankungen immer noch die Todesursache Nummer eins. Bisher wurden hauptsächlich nur die Rolle und die Modifikationen von LDL und der Einfluss des Cholesterins in den Mittelpunkt der Atheroskleroseforschung gestellt, nachdem der Nikotinabusus, die Adipositas, eine arterielle Hypertonie, ein Diabetes mellitus und eine positive Familienanamnese empirisch erwiesene Risikofaktoren für die Entwicklung kardiovaskulärer Inzidenzen darstellen. In letzter Zeit rücken zunehmend auch andere Mechanismen, die einen möglichen relevanten Einfluss auf die Atherogenese haben ins Rampenlicht. Heutzutage ist gesichert, dass es sich beim Prozess der Entstehung der Atherosklerose um eine Entzündungsreaktion handelt, die alle Eigenschaften aufweist, die zur Definition einer Entzündungsreaktion von Nöten sind. Eine ursächliche Rolle bei dieser Reaktion spielen dabei die Akute Phase Proteine, allen voran hierbei das C - reaktive Protein. Zahlreiche Epidemiologische Daten zeigen einen Zusammenhang von erhöhten Serumwerten für CRP und dem Auftreten von Atherosklerose (Haverkate et al. 1997, Ridker et al. 1997, Koenig et al. 1999). Das CRP besitzt viele immunmodulatorische Eigenschaften, die vielleicht die auftretenden Ereignisse während der Atherogenese erklären könnten, welche größtenteils bis heute nicht richtig verstanden sind, aber eine aktive Rolle des Moleküls in der Entstehung der Atherogenese vermuten lassen. Dazu zählen Beobachtungen, wie die Aktivierung des Komplementsystems über den

klassischen Weg mit dem Nachweis der Kolokalisation von CRP und dem Komplementkomplex C5b bis C9, in frühen atherosklerotischen Läsionen (Volanakis et al. 1982), die aktivierende Wirkung von CRP auf Monozyten und Makrophagen, sowie sein inhibtorischer Einfluss auf neutrophile Granulozyten (Mortensen et al. 2000, Torzewski et al. 2000). Diese Arbeiten sprechen für eine chronische CRP vermittelte Komplementaktivierung in der Arterienwand, welche wohl auf die Atherogenese unterstützend einwirkt. Damit könnte dem CRP bei der Initiation der humoralen Entzündung in einer frischen atherosklerotischen Läsion eine bedeutende Rolle zukommen (Torzewski et al. 1998). CRP kann in vitro Calciumabhängig LDL binden und opsoniert, komplementabhängig, zahlreiche biologische Partikel (Bhadki et al. 1999, de Beer et al. 1982). Es kann an Lipide gebunden die Arterienwand infiltrieren und von Lipiden festgehalten werden. Auch konnte eine Kolokalisation von Schaumzellen in diesem Zusammenhang gezeigt werden (Torzewski et al. 1998). CRP ist in der Lage, biologische Partikel zu opsonieren und Monozyten bzw. Makrophagen zu stimulieren. Die CRP induzierte Monozytenchemotaxis und die über CRP vermittelte LDL -Aufnahme geschieht über den spezifischen Rezeptor FcγRIIa (Bharadwaj et al. 1999). Da CRP und Schaumzellen in den sog. „fatty streaks“ kolokalisiert sind könnte dies ein wichtiger Hinweis für eine Involvierung des CRP in den Ablauf der Schaumzellbildung sein (Torzewski et al. 1998).

Diese pathophysiologischen Eigenschaften des CRP lassen die Frage aufkommen, ob es sich bei dem Akute Phase Protein CRP um einen sensitiven Marker für die systemische Inflammation handelt, oder ob CRP selbst aktiv am Prozess der Atherogenese beteiligt ist.

4.1 Ergebnisse der Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein Zellkulturmodell zu entwickeln, mit dessen Hilfe es möglich sein sollte, Pharmaka auf ihre inhibitorischen Effekte hin zu überprüfen, die eine CRP Expression in Hepatozyten zu supprimieren vermögen und damit möglicherweise in einem langfristigen therapeutischen Ansatz die Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen reduzieren könnten.

Darauf abzielende bisherige Versuche mit Statinen (Ridker et al. 1998, Ridker et al. 2001), ACE-Inhibitoren (Yusuf et al. 2000) und ASS (Ridker et al. 1997), ergaben eine Reduzierung der CRP Serumwerte, die aber wahrscheinlich indirekt über die antiinflammatorischen Eigenschaften dem Fortschreiten der Atherosklerose entgegenwirkten. Jedoch konnte bisher noch keine Substanz gefunden werden, die die CRP Plasmaspiegel über einen direkten Weg auf Rezeptorebene, im Bereich des CRP Promotors oder sogar dessen Genexpression selbst, bzw. auf der Ebene der CRP -vermittelten Komplementaktivierung spezifisch, zu reduzieren vermag.

In der vorliegenden Arbeit wurde exemplarisch untersucht, wie sich die CRP Synthese am Ort ihrer Entstehung, den Hepatozyten, durch verschiedene STATs und Interleukine beeinflussen lässt. Am deutlichsten kristallisierte sich dabei der Einfluss von STAT3 als potentester Enhancer der CRP Biosynthese heraus, der mittels eines eigens erstellten Zellkulturmodells näher untersucht wurde (siehe Abschnitt 3.2). Das hierbei entstandene Zellkulturmodell bietet weiterhin die Möglichkeit pharmakologische Interaktionen, mit dem Ziel der Reduzierung der CRP Spiegel an ihm direkt zu testen, und in vitro Versuche mit verschiedenen Interaktionssubstanzen, z.B. auch im Rahmen eines High Throughput Screenings zur Identifizierung von inhibitorischen Substanzen auf die CRP Expression zu ermöglichen.
Um eine Entzündungsreaktion zu imitieren und eine gesteigerte CRP Produktion zu provozieren, wurden die HepG2 Zellen für 24 Stunden mit unterschiedlichen humanen Interleukinen stimuliert. Zunächst konnte für die HepG2 Zellen bereits eine basale CRP Produktion bei unbehandelten, unstimulierten Zellen auf niedrigem Niveau ausgemacht werden. Als Reaktion auf die Stimulantien zeigte

sich eine Dosis –Antwort –Beziehung mit der höchsten CRP Synthese für Interleukin 6 bzw. in Kombination aller drei Stimulantien.
Die Maße der Stimulierbarkeit, der Einfluss der Transkriptionsfaktoren und das deutlichste Ansprechen des mit dem STAT3 Plasmid kotransfizierten Zellmodells ist für die transienten Transfektionen in den Abbildung 3.2 bis 3.6 verdeutlicht.

Es war im Rahmen dieser Arbeit bzw. mit den verwandten Techniken nicht möglich zu zeigen, wie viele Plasmide in die einzelnen Hep G2 Zellen bei dem Vorgang der stabilen Transfektion eingebaut wurden, bzw. es ist in diesem Zusammenhang davon auszugehen, dass nicht in allen durch die stabile Transfektion entstandenen Zellklonen die gleiche Anzahl an Transkriptions- und CRP Promotorplasmiden transfiziert wurde und damit ist der Vergleich der Zellklone insbesondere der stabilen Transfektionen von STAT3 und den ABEK14 Zellen untereinander, also im direkten gegenüberstellenden Vergleich, erschwert. Durch die hohe Zahl der bei den stabilen und transienten Tranfektionen verwandten Zellen, ist aber von einem aussagekräftigen statistischen Mittel für die erfolgreiche Zelltransfektion beider Zelllinien auszugehen und damit sollte das Argument der unterschiedlich starken Transfektionseffizienzen im Hinblick auf die zuerst durchgeführten transienten Transfektionen geschwächt werden können. Es ist davon auszugehen, dass in allen Zellpopulationen eine ausgeglichene gleich große Anzahl an HepG2 erfolgreich mit den geforderten Plasmiden transfiziert werden konnte und somit ist eine Vergleichbarkeit der Stimulationsergebnisse bei gleichem Versuchsaufbau durchaus gegeben. Allerdings ist es erschwert diese Aussage aufrechtzuerhalten, wenn man sich der Technik der stabilen Transfektionen nähert. Dabei wird im allgemeinen Verständnis davon ausgegangen, dass die Kotransfektion mit dem CRP/ Promotorkonstrukt und dem STAT3/ Neomycin Plasmiden nur für wenige Zellen gelingt und eine jede mit allen Plasmiden erfolgreich doppelt transfizierte Zelle den Ursprung eines einzigen Zellklons bildet. Was bedeutet, dass bei diesem Umstand gänzlich keine Aussage über die Zahl der dabei in den neuen Zellklon transfizierten Plasmide mehr möglich ist und auch über das Verhältnis der beiden Kotransfekten von Antibiotikaresitenz mit Transkriptionsfaktor STAT3 und dem CRP Promotorkonstrukt zueinander kann keinerlei Aussage gemacht werden. Eine somit möglicherweise unterschiedliche Zahl an eingebrachten Plasmiden beim

Vorgang der stabilen Transfektion, hat dem Verständnis nach, eine höhere oder eine niedrigere Proteinbiosynthese aus dem Zielgen zur Folge und erschwert somit folglich die Vergleichbarkeit der Stimulationsergebnisse der Zellklone untereinander enorm. Daher ist auch eine vergleichende Aussage mit den ABEK14 Zellen, über den Einfluss des STAT3s im Direktvergleich mit dem in dieser Arbeit erstellten STAT3 Zellkulturmodell äußerst schwierig, da es nicht möglich ist das Verhältnis der Mengen der stabil transfizierten CRP Promotorkonstrukte, beider Zellmodelle zueinander, anzugeben und zu vergleichen. Man ginge damit von unterschiedlichen Ausgangssekretionen für das CRP aus und dies erschwert damit die Vergleichbarkeit zur Aussagefindung für den Transkriptionsfaktoreneinfluss. Allerdings kann über die α -Tubulin Ladekontrolle ein Vergleich des STAT3 Gehalts des neuen Zellkulturmodells im Vergleich zu humanen Hepatozyten gemacht werden, also eine Vergleichbarkeit des Transkriptionsfaktorgehalts im Vergleich zu den physiologischen Gegebenheiten in vivo. Und ebenfalls erlaubt der Versuchsaufbau der transienten Transfektionen einen Vergleich der STATs untereinander und somit ist die eindeutige Aussage möglich, welches STAT den potentesten und damit am stärksten steigernden Einfluss auf den CRP Promotor hat.

Auch kann mit den gezeigten Versuchen und mit Hilfe der durchgeführten Untersuchungen keine Aussage über den Ort des Einbaus der Plasmide getroffen werden, da der Einbau bei einer Transfektion zufällig und ohne Positionskontrolle erfolgte. Dadurch könnten in der Zelle notwendige und aktive Gene verändert, deaktiviert und unbrauchbar gemacht werden, die das Überleben oder die Zellreproduktion beeinträchtigen oder stoppen könnten. Dieser Umstand könnte mit ein Grund sein, warum nur so wenige Klone bei den stabilen Transfektionsversuchen entstanden sind, wenn man beachtet, dass durch den Einbau des zu transfizierenden Plasmids das physiologische Gleichgewicht der Genexpression der Zielzelle gestört wird. Obwohl die HepG2 Zellen schon eine maligne Zelllinie sind wäre es auch möglich durch die Beeinflussung solcher stabiler Transfektionen Krebs oder deren Enhancergene zu aktivieren bzw. Krebssuppressorgene zu inaktivieren, die das Wachstumsverhalten der Zellen und damit die Vergleichbarkeit der HepG2 Kulturen an sich beeinflussen können. Diese Überlegungen müssen vor allem im Hinterkopf behalten werden, wenn man

sich an Versuche mit humanen Hepatozyten macht, da die Transformation primärer Hepatozyten, durch die Aktivierung maligner Enhancergene bzw. durch Inaktivierung von Krebssuppressorgenen, in eine maligne Zelllinie einen unberechenbaren Umstand darstellt.

All diese erwähnten Umstände erschweren damit insgesamt die Vergleichbarkeit des gegenüberstellenden Versuchs der STAT3 Zelllinie mit den sonst exakt gleich hergestellten und mit den gleichen Plasmiden transfizierten ABEK 14 Zellen (siehe Abbildungen 3.12 und Abbildung 3.13). Hierbei sollte der direkte Einfluss des Transkriptionsfaktors STAT3 gezeigt und im Direktvergleich verdeutlicht werden, aber da keine Aussage über die Zahl der eingebauten Plasmide bei beiden stabilen Transfektionen gemacht werden kann, wäre es also prinzipiell möglich, dass die Vergleichbarkeit schon deswegen eingeschränkt ist, weil die STAT3 Zelllinie beispielsweise mehr Plasmide für das CRP Luciferase Promotorkonstrukt stabil integriert haben könnte und der stimulatorisch steigernde Effekt somit nicht ausschließlich auf einer durch STAT3 basierenden transkriptionellen Expressionssteigerung beruhen könnte. Andererseits könnte argumentiert werden, dass bei einer stabilen Transfektion die Zahl der einzubringenden Plasmide stets begrenzt ist, weil die Transportkapazitäten über die Zellmembran äußerst begrenzt sind und damit der Verdacht einer Verschiebung der Plasmidzahl zugunsten einer höheren der ABEK 14 denkbar wäre, da für die STAT3 Zelllinie ein größeres, längeres Plasmid stabil ins Genom eingebaut werden muss.
Eine Klärung dieser Fragen ist mit den in dieser Arbeit verwandten Mitteln nicht möglich und somit bleibt es offen, ob tatsächlich der signifikant gestiegene Expressionseffekt des CRP der STAT3 Zelllinie, allein auf die Anwesenheit des STAT3 beruht. Diesem Sachverhalt Rechnung tragend, muss die Verwertbarkeit der stabilen Transfektion mit Vorsicht bewertet werden, während die transiente Transfektion keine zwingende Integration der Plasmide in ihr Genom zeigen muss und damit nicht unbedingt Einfluss auf ihre Zellaktivität und ihren Stoffwechsel nimmt, könnten die stabilen Transfektionen Störungen durch Geninteraktionen durch den stabilen Plasmideinbau erfahren und damit andere Eigenschaften aufweisen, als ihre Ursprungszelllinie.

Bei den Versuchen zeigte sich eine signifikante Modulation der CRP Synthese durch die unterschiedlichen Interleukine und Transkriptionsfaktoren und es wurde untersucht welchen Einfluss diese auf die Regulation der CRP Biosynthese hat.
Da Interleukin 6 in nachgewiesener Weise die CRP Synthese in menschlichen Hepatozyten stimuliert, könnte in Zukunft möglicherweise auch eine Inhibition der Interleukin Produktion oder seiner Wirkorte am CRP Gen ein Mittel zur Reduktion erhöhter CRP Werte, bei kardiovaskulären Risikopatienten, sein.
In den vorgestellten Versuchen wird deutlich welche Unterschiede es für die Stimulierbarkeit der zusätzlich mit STAT3 transfizierten Zellen im direkten Vergleich zu den ABEK14 Zellen, denen das STAT3 fehlt, gibt. Diese sind besonders deutlich für das Zytokin IL -1β. Hierbei ist das Verhältnis der ABEK14 Zellen zu den vorgestellten STAT3 Zellen bei Stimulation mit IL -1β um den Faktor 2,91 höher. STAT3 scheint daher einen signifikanten Einfluss auf den Zytokinsignalweg von IL -1β zu haben.
Im Gegensatz dazu fällt bei dieser Gegenüberstellung auf, dass das Ausmaß der Stimulation für PDBu für die ABEK14 Zellen deutlicher ausfällt. Diese scheinen maßgeblicher auf den Proteinkinase C Pathway anzusprechen, im Unterschied zu den STAT3 Zellen.
Die Zugabe von IL -6 bewirkt bei der stabilen STAT3 Transfektion keine Steigerung in der CRP Expression, hier lassen sich erneut die ABEK14 Zellen um den Faktor 3,6 ± 0,2 größer im Vergleich zu den STAT3 Zellen stimulieren. Für die Kombination von IL -1 und IL -6 lässt sich die STAT3 Zelllinie ausgewogen zu den ABEK14 Zellen stimulieren und für die Kombination aller drei verwandten Stimulantien mit IL -1, IL -6 und PDBu zeigen erneut die ABEK14 Zellen ein größeres Ansprechen, was sich möglicherweise auf ihr verstärktes Stimulierverhalten in Bezug auf den Proteinkinase C Pathway zurückführen lässt.

Als Ergebnis bleibt also eine feststellbare Steigerbarkeit der CRP Promotoraktivität durch die zusätzliche stabile Transfektion von STAT3 speziell für das Interleukin IL -1β um den 2,5 -fachen Wert, bei Gegenüberstellung mit der vergleichbaren Zelllinie ABEK 14, die diesen Transkriptionsfaktor nicht trägt. Was im Einzelnen zu dieser Steigerung, oder was die maßgebliche Rolle des STAT3 bei der CRP Genexpression im Zusammenhang mit IL -1β ist, konnte mit diesem Versuchsaufbau nicht geklärt werden.

4.2 CRP als Targetmolekül zur Prävention der Atherosklerose

Die in dieser Arbeit gewonnen in vitro Erkenntnisse können einen Beitrag zum Verständnis der Regulation der CRP Biosynthese liefern und die Grundlage zum Anlass weiterer Nachforschungen mit dem Ziel durch eine Senkung von CRP Plasmaspiegeln die Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen bei Risikopatienten reduzieren zu können.

Da in der Klinik bereits geringe Erhöhungen der Basis CRP Werte als Zeichen einer chronischen Entzündung verstanden werden und man heutzutage für die Atherosklerose eine chronisch entzündliche Genese annimmt, kommen die Untersuchungen von Voleti im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit sehr nahe. In einem Hep3B Zellmodell konnte Voleti zeigen, dass eine Stimulation der Hep3B Zellen, einer verwandten Zellreihe der in vorliegenden Arbeit verwendeten HepG2 Zellen, durch Interleukin 6 die CRP Expression steigerte und die Produktion von STAT3 und C/EBPbeta damit angeregt wurde (Voleti 2005). Interleukin 1 fiel dabei durch einen synergistischen, verstärkenden Effekt für das Interleukin 6 auf. Ein ähnliches Bild zeigt sich in den vorgelegten Versuchen mit den ABEK14 Zellen. Die STAT3 Zelllinie zeigt hingegen ein verstärktes Ansprechen auf das Interleukin 1β und eine geringere synergistische Ausprägung der CRP Expression bei der Kombination beider Interleukine. Dieser Vergleich mit den Versuchen von Voleti ist ein weiterer Hinweis auf die offensichtlich vornehmlich auf IL -1β konzentrierte Interaktion des STAT3. Die ersten 157 Basenpaare des proximalen CRP Promotors sind die Andockstelle für das Interleukin 1, sowie für NF –kappaB ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der wiederum mit dem Transskriptionsfaktor C/EBPbeta synergistisch, aber nur bei dessen notwendiger Existenz, auch interagiert (Voleti et al. 2005). Diese Untersuchung unterstreicht die wichtige und zentrale Bedeutung der Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der CRP Expression. Voleti machte den regulierenden Rezeptor hierfür, als eine überlappende Bindungsstelle für NF -kappaB (p50 -p50 und p50 -p65) sowie für OCT -1 aus. Weiterhin geht aus den Untersuchungen hervor, dass die KappaB Bindungsstelle, die für den Synergismus zwischen NF -kappaB und C/EBPbeta verantwortlich ist und darüber hinaus auch für die CRP Transaktivation mittels C/EBPbeta, an der C/EBP Bindungsstelle notwendig und unabdingbar ist. Mutationen an der Bindungsstelle

für KappaB verminderten den synergistischen Effekt des IL -1β für die IL -6 induzierte CRP Expression. Die basale CRP Expression stieg dramatisch an, als die Bindung sowohl an OCT -1 als auch an NF -kappaB verhindert wurde. Diese Untersuchungen erfolgten ebenfalls mit Hilfe des Luciferase Transaktivations Assay Systems und EMSA (electrophoretic mobility shift assay) und ließen den Schluss zu, dass die Bindung von OCT -1 an den CRP Promoter, erleichtert durch p50 -p50, über einen nicht vollständig geklärten Weg, die CRP Expression über Transkriptionsfaktoren mindert, während die Entfernung von OCT -1 durch p50-p65 die CRP Transkription in Kooperation mit C/EBPbeta deutlich ansteigen lässt. Voleti wollte damit eine Erklärung für die unterschiedlichen Basis -CRP Werte in der Bevölkerung geben und bestätigt damit die in dieser Arbeit vermutete These der zentralen Rolle der Transkriptionsfaktoren für das Ausmaß der CRP Expression.

Arnaud hat kürzlich in diesem Zusammenhang eine Untersuchung veröffentlicht, die einen direkten Zusammenhang des CRP mit seinen proinflammatorischen Eigenschaften als proatherogenen Faktor deklarieren könnte. Er beschreibt den nachgewiesenen Umstand, dass β –HMG -CoA Reduktase Inhibitoren, oder auch Statine genannt, bewiesenermaßen kardiovaskuläre Ereignisse und die Mortalität sowohl bei Patienten mit, als auch bei solchen ohne koronarer Herzkrankheit reduzieren können (Arnaud et al. 2005). Dabei senken die Statine zusätzlich oder als Nebeneffekt auch die Plasma CRP Werte im Blut. Arnaud konnte zeigen, dass Statine dies über eine Reduzierung der IL -6 induzierten Protein und RNA Produktion in humanen Hepatozyten bewirken. Dabei beschreibt er die Steigerung der CRP Expression nach einer Bindung von IL -6 an dessen spezifischen Rezeptor, dessen Aktivierung über eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 von statten geht. Es liegen Hinweise vor, dass Statine möglicherweise genau diese Phosphorylierung und damit die notwendige Dimerisierung des STAT3 verhindern, ohne die es nicht zur Entfaltung der transkriptionssteigernden Wirkung des STAT3 und damit zur Steigerung der Zielprotein Expression kommt (Arnaud et al. 2005). Die Idee hierbei ist, dass Statine als direkt antiinflammatorisch wirkende Pharmaka einen Weg darstellen könnten, auf dem kardiovaskuläre Ereignisse reduziert werden können, in dem durch eine Verhinderung der Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT3

durch β -HMG CoA Reduktasehemmer ein geringerer Anstieg des CRP erfolgt und schließlich die Folgen von erhöhten CRP Werten nicht oder nicht in vollem Umfang zum Tragen kommen. Da Statine bereits zugelassene und weit verbreitete Pharmaka sind, bietet sich die Untersuchung in klinischen Studien bezüglich ihres Einflusses auf die Atherosklerose an. Die Schwierigkeit bei der Klärung der Frage in wie fern Statine eine antiatherogene Medikation darstellen ist, ob diese antiatherogene Eigenschaft der Statine auf einer Reduktion des sich im Blut befindlichen Cholesterins beruht, oder ob dies der Fall ist in dem sie in die Interaktion von STAT3 und IL -6 bei der Induktion der CRP Expression eingreifen und diese behindern. Möglicherweise ist dabei die Kombination beider Umstände maßgeblich, aber es wird schwierig sein zu verdeutlichen, welchen Einfluss nur die Statin abhängige Inhibition der Interaktion von STAT3 und IL-6 darstellt.

Den Nutzen des C -reaktiven Proteins als einen unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse konnte durch McCarty, zumindest teilweise erhärtet werden. Er beschreibt eine direkte ungünstige Wirkung des CRP auf die endotheliale Funktion. Dabei führen mäßig erhöhte CRP Konzentrationen zu einer verminderten Expression der endothelialen Isoform der Nitrit Oxidsynthase in endothelialen Zellen. Die Idee genau diesen Zusammenhang zur Reduktion von kardiovaskulären Events zu nutzen, war dabei offensichtlich, aber sie ist bisher noch nicht gelungen (McCarty et al. 2004).

4.3 Möglichkeiten zur Reduktion von CRP Serumwerten

Strategien zur Verminderung von erhöhten CRP Werten kann durch Statine, Thiazolidinedione und durch Metformin erreicht werden. Auch ein moderater Konsum von Alkohol und eine Gewichtsanpassung sind als Strategien zur Erreichung dieses Ziels – wie teilweise auch schon beschrieben – ebenfalls hilfreich. Der antidiabetische Effekt des Metformins hat seinen Ursprung in der Aktivierung der AMP -aktivierten Kinase (AMPK). AMPK kann eNOS (siehe Abschnitt 4.2) stimulieren, welches seine Produktionsstätte in den Hepatozyten findet. Es konnte gezeigt werden, dass Nitrit Oxid die Aktivität von STAT3 durch Interleukin -6 in den Hepatozyten vermindert, wobei STAT3 entscheidend für die IL -6 vermittelte Induktion des CRP und auch für die zahlreicher weiterer Akute Phase Reaktanten ist. Die Idee also, dass entweder das Metformin, oder AMPK die hepatische CRP Produktion inhibiert, hat mit einem Anstieg der hepatischen Nitrit Oxid Synthese zu tun, die im weiteren Verlauf ihrerseits die Aktivierung von STAT3 und schließlich auch die CRP Transkription behindert (McCarty et al. 2004). Eine eingehende Untersuchung dieser Hypothese in einem Zellkulturmodell mit humanen Hepatozyten steht noch aus. Obwohl die Wirkung des Metformins auf die Plasma IL -6 Werte auch noch nicht experimentell gezeigt wurde, ist doch die Wahrscheinlichkeit, dass die Aktivierung von AMPK einen möglichen Einfluss, auch auf die Sekretion - genau diesen Interleukins - in Adipozyten hat. Ein solcher Ansatz, zur Reduzierung kardiovaskulärer Erkrankungen über den Weg von IL -6 und über STAT3 auf die CRP Expression verdient in Zukunft eine genauere Untersuchung (McCarty et al. 2004).

Auch in diesen Untersuchungen konnte wieder der Einfluss der pharmakologischen Interaktionen mit der CRP Expression eines Wirkstoffes der bereits zugelassen und im Arzneimittelhandel erhältlich ist und damit die Möglichkeit der medikamentösen Wechselwirkung auf den in dieser Arbeit untersuchten Signalweg aufgezeigt werden und dessen möglicher therapeutischer Ansatz in seiner Vielfältigkeit betont werden.

In weiterer Anlehnung an diese Arbeiten gibt es aus dem Jahre 2003 Untersuchungen von Agrawal, in der er das C -reaktive Protein, den Prototypen der humanen akuten Phase Proteine, in Hep3B Zellen untersucht hat, um den Zusammenhang der Interaktion von IL -1β und IL -6 zueinander, bzw. deren gegenseitige Abhängigkeiten zu klären. Er bestätigt die CRP Expressionssteigerung durch IL -6 in Hep3B Zellen, während IL -1β, das bei alleiniger Zuführung keinerlei stimulierende Effekte zeigt, hierbei synergistische und verstärkende Effekte auf die IL -6 Stimulation aufweißt. Weiterhin erwähnt er, dass in vorausgegangenen Studien des proximalen CRP Promoters eruiert wurde, dass STAT3 und die durch C/EBPbeta vermittelte IL -6 induzierte Transkription mit Rel p50, synergistisch mit C/EBPbeta auf den CRP Promotor einwirken, wobei insbesondere das Fehlen von p65 zu einer nachfolgenden Verstärkung der CRP Transkription führt. Dabei ist bis heute weder ein Anhalt für die Notwendigkeit noch eine Bindungsstelle für das Heterodimer des klassischen Nukleären Faktors (NF) -kappaB p50/ p65 gefunden worden. Die Überlegungen dieser Untersuchungen wurden angestellt, um herauszufinden, inwieweit ähnliche neuartige Transkriptionsfaktoreninteraktionen eine regulierende Wirkung auf das Gen des CRP ausüben und damit beeinflussbar machen (Agrawal 2003). In seinen Versuchen beschreibt er bei einer vorübergehenden Überexpression von p50 oder p65 eine dadurch induzierte CRP mRNA Akkumulation in den Hep3B Zellen. Das p50/ p65 Heterodimer fällt dabei durch eine deutlich effektivere, also bedeutend stimulierendere Komponente auf den CRP Promotor auf, als dies die Homodimere von p50 oder p65 allein vermögen. Eine Koüberexpression von sowohl p50 oder p65, als auch C/EBPbeta oder STAT3, verstärken synergistisch die CRP Expression im Zellkulturmodell. Die stärkste, maximale Expression von CRP war in diesem Modell erwartungsgemäß bei einer Überexpression aller vier Transkriptionsfaktoren zu beobachten. Vergleichbare Effekte wurden bei einer Behandlung der Zellen, die ihrerseits sowohl STAT3, als auch C/EBPbeta überexprimierten, durch eine Zugabe von IL -1β zu finden. Daten aus dem Human Genom Projekt zeigen diesbezüglich 13 mögliche Andockstellen für kappaB in den ersten 4000 Basenpaaren des CRP Promotors, bei der nur eine, mit einer Position bei 2652 bp, es vermag das nukleäre p50/ p65 Heterodimer nach seiner Aktivierung durch IL -1β zu binden. Die Untersuchung zeigt also, dass die klassische NF -kappaB Aktivierung einen Anteil an der endogenen CRP Induktion

hat und als aktiviertes NF -kappaB einen synergistischen und verstärkenden Effekt sowohl auf C/EBPbeta und auf STAT3 hat. Aus diesem Ergebnis der Beobachtungen lässt sich die Vermutung schließen, dass die Aktivierung von NF -kappaB für den synergistischen Effekt des IL -1β auf die IL -6 induzierte CRP Expression verantwortlich sein könnte, da IL -1β allein keine Wirkung auf den CRP Promotor zeigt (Agrawal et al. 2003).

In Folge eines inflammatorischen Prozesses kommt es zu einem rapiden Anstieg von reagierenden Faktoren im Blut und dabei im besonderen der Akute Phase Proteine, deren Synthese in Hepatozyten durch Zytokinstimulation angeregt wird. Obwohl in diesem Rahmen ein dramatischer Anstieg der Werte des C -reaktiven Proteins für die allermeisten Säugetieren zu beobachten ist, hat die Maus als hauptsächliches Akute Phase Protein ein homologes Pentraxin, das Serum Amyloid P -component, während das CRP lediglich in Form eines untergeordneten Akute Phase Reaktans in Erscheinung tritt. Der molekulare Hintergrund für die deutlichen Differenzen der SAP und CRP Genexpressionen der Maus sind aktuell noch nicht entschlüsselt. Die Untersuchungen durch Transfektionen von Maushepatomzellen, mit einem CAT (Chloramphenicol Acetyltransferase) – Reporterkonstrukt zur Expressionsdetektion, welches auf die 5' -gerichtete Region des Maus CRP Gens zeigt weisen darauf hin, dass die Transkription entweder durch IL -6 oder durch IL -6 plus IL -1 stimuliert werden muss, wenn mehr oder genau 360 bp des proximalen, in Richtung des 5' -zeigenden DNA Segmentes, präsent waren. Untersuchungen hingegen der 5' -Region des Maus SAP Gens ließen erkennen, dass die Region um die -433 bp und -397 bp vor Beginn der transkriptionellen Geninformationen auf IL -1 und auf IL -6 durch Bindung von sowohl STAT3 als auch von C/EBPbeta reagieren. Diese reagierende Region besteht aus zwei angrenzenden, übereinstimmenden C/EBPbeta Abschnitten die mit zwei ebenfalls ähnlichen STAT3 Regionen überlappen (Ochrietor 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Bindung von C/EBPbeta sich an zwei Stellen, und für STAT3 ebenfalls sich für zwei Bindungsstellen, heraus zu kristallisierten scheint. Im Gegensatz dazu wurde der 360 bp lange Promoter des CRP Gens nur von STAT3 gebunden. Für C/EBP konnte also keine Andockstelle in diesem Genabschnitt ausgemacht werden. STAT3 erscheint also notwendig sowohl für das Maus SAP, als auch für die CRP Gentranskription, da eine

Überexpression einer inaktiven Deletionsmutante des STAT3 die Transkription beider Gene hemmt (Ochrietor et al. 2000). Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Transkriptionsfaktoren, sowohl das in dieser Arbeit untersuchte STAT3 als auch das C/EBPbeta an der SAP Genexpression im Mausmodell teilhaben, wobei nur das STAT3 eine Bedeutung für die CRP Genexpression bei der Maus zeigt. Obwohl es Unterschiede zwischen dem Immunsystem der Maus und dem des Menschen gibt, lassen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass die Erkenntnisse über die Maus SAP Genexpression mit den bekannten Interaktionen zwischen diesen beiden Transkriptionsfaktoren auf die Verhältnisse für humane CRP Gentranskription vereinbar und übertragbar sind.

Es gibt auch Untersuchungen zur Wirkung von Steroiden auf die CRP Expression die bekanntlich eine immunsuppressive Wirkung haben und damit im Verdacht stehen ebenfalls einen Beitrag zum gesuchten Ziel, einen CRP Expressionsinhibitor zu finden, leisten zu können. Dabei ist eine positive Modulation in einer Veröffentlichung von Depraetere für CRP durch Dexamethason beschrieben. Die Art und Weise auf die das Glucocorticoid eine CRP Antwort auslöst, hängt dabei vom Zeitpunkt der Applikation ab. Depraetere inkubierte zu diesem Zweck HepG2 Zellen und stimulierte sie simultan mit IL -6 und mit dem Steroid Dexamethason. Dies führte zu einem Anstieg der Konzentration an CRP im Versuch, welche signifikant über dem Anstieg lagen der durch IL -6 allein verursacht werden konnte. Nach einer Präinkubation der HepG2 Zellen mit Dexamethason war die Kinetik der CRP Freisetzung, die durch IL -6 induziert wurde, erhöht und erreichte vergleichbare Werte mit der Kinetik wie sie bei einer Stimulation mit Alpha 1 -Acid Glykoprotein (alpha 1 -AGP) ohne die Dexamethasonvorbehandlung zu beobachten ist (Depraetere et al. 1991). Ähnliche Versuche gibt es von Smith der den Effekt des Kortikosteroids Prednisolon auf die Produktion von IL -1 alpha und IL -1β von durch Lipopolysaccharide (LPS) stimulierte Monozyten untersucht hat. Dies führte bei humanen Hepatoma HepG2 Zellen zu einer Produktion von Serum Amyloid A (SAA) und von C -reaktivem Protein (Smith et al. 1992). Diese Produktion des SAA und des CRP durch die HepG2 Zellen wurde auch bei einer Exposition verschiedener Kombinationen und Konzentrationen von rekombinantem humanem (rh) IL -1 alpha, rhIL -1β, rhIL -6, rekombinantem humanem Tumor Nekrosis

Faktor -alpha (rhTNF -alpha) und von Prednisolon deutlich. Dies zeigte, dass Prednisolon die Produktion beider Interleukine IL -1 alpha und IL -1β substantiell inhibiert und es wurde klar, dass IL -1β der potentere Induktor für die SAA Produktion ist. Für die CRP Produktion zeigten sich bezüglich der Potenz von IL -1 alpha und IL -1β äquivalente Wirkstärken. Für das Prednisolon konnte gezeigt werden, dass es die Produktion von CRP, im Gegensatz zu Dexamethason, nicht zu verstärken vermag (Smith et al. 1992).

4.4 neue Signalwege: Proteinkinase C Pathway und CRP Expression

Die ausführliche Darstellung der Stimulantien und ihrer Wege, die zur Aktivierung des CRP Promotors und zu seiner Synthese in Hepatozyten mit anschließender Freisetzung führen sind hauptsächlich für Interleukin -1β (IL -1β) and IL -6 erläutert. Hiermit soll noch der Hintergrund des in dieser Arbeit zusätzlich verwandten Proteinkinase C Pathways diskutiert werden (siehe Abschnitt 3.3 und Abbildungen 3.12, 3.13). Vor kurzem gab es Anhalte für einen zusätzlichen Signalweg der für die Regulation der CRP Expression eine Mitverantwortung trägt (Ivashchenko et al. 2005). Dazu wurden primäre humane Hepatozyten (PHH) mit IL -1β, IL -6 und dem Protein Kinase C (PKC) Aktivator 4α -Phorbol 12,13 -Dibutyrat (PDBu) behandelt. Der Grad der Stimulierbarkeit der CRP Expression wurde mittels quantitativer RT -PCR und ELISA analysiert. Dabei zeigte sich, dass PDBu die CRP Transkription signifikant um das 21,0 ± 9,24 - fache induziert, aber die Proteinfreisetzung stieg lediglich um das 2,9 ± 0,5 -fache. Eine kompetitive Inhibition mit dem Bisindolylmaleimid Derivat LY333531, verhinderte die PDBu -vermittelte Promotoraktivität. Dasselbe konnte für eine kompetitive Inhibition mit dem IkappaB Kinase Inhibitor I229 für den PDBu Effekt auf das Zellkulturmodell festgestellt werden. Bemerkenswert bei dieser Untersuchung ist zudem noch die Tatsache, dass IL -8 eine signifikante Induktion der CRP Freisetzung in PHH um das 58,675 ± 19,1 -fache zur Folge hatte, ein Effekt der sich wiederum durch die Zugabe von LY333531 blockieren ließ (Ivashchenko et al. 2005). Es scheint also einen bisher noch nicht näher beschriebenen, neuen PKC -abhängigen, die transkriptionelle Regulation der CRP Genexpression betreffenden, Pathway zu geben der in Analogie zu den klassischen IL -1β und IL -6 Signalwegen,

ausschließlich in Hepatozyten vorkommt. Im Weiteren zeigt sich, dass das IL -8 ein potenter und physiologischer PKC Aktivator zu sein scheint (Ivashchenko et al. 2005). Diese transkriptionelle Regulation wurde an HepG2 Zellen mittels einer stabilen Transfektion mit dem 1 -kb CRP Promotor (ABEK14 Zellen) untersucht und hat damit große Ähnlichkeiten mit dem in der vorliegenden Arbeit verwandten STAT3 Zellkulturmodell. Aus diesem Grund liegen für das mittels stabiler Transfektion für STAT3 erstellte Zellkulturmodell ebenfalls Versuche zur Stimulierbarkeit und Untersuchungen zum Einfluss des STAT3 auf den Protein Kinase C Pathway vor. Das in dieser Arbeit gewonnene Modell oder das der HepG2 -ABEK14 Zellen könnten beide im weiteren Sinne ein sehr geeignetes Medium zur Durchführung von High Throughput Screenings (HTS) sein mit deren Hilfe es gelingen könnte Inhibitoren für die CRP Synthese zu finden, die möglicherweise die langfristige Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen ermöglichen könnten.

Das Serum C -reaktive Protein wurde bislang nur als autonomer Marker für das Ausmaß der Atherosklerose bei Patienten mit koronaren und zerebrovaskulären Erkrankungen, sowie bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit angewandt. Vainas stellte dabei kürzlich die Hypothese auf, dass möglicherweise CRP nicht nur als ein Marker, sondern auch als ein aktiver Teilhaber an der Atherogenese, auch außerhalb der Leber, in femoralen atherosklerotischen Plaques produziert wird (Vainas et al. 2005). Für diese eventuell vorliegende ektope Produktion von CRP in atherosklerotischen Läsionen gibt es noch weitere Anhaltspunkte. Eine brandaktuelle Studie untersuchte hierbei die CRP Freisetzung in atherosklerotischen Plaques und in Gefäßwänden, die durch das Einbringen eines Stents als Maßnahme der interventionellen Koronarangiographie erfolgten. Dazu wurden in einem ersten Protokoll das CRP im Serum des koronaren arteriellen Blutes distal und proximal der vermuteten atherosklerotischen Läsion bei Patienten mit instabiler und mit stabiler Angina pectoris untersucht. In einem zweiten Protokoll wurden die Serum CRP Werte auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten im koronaren Sinus und im peripheren Blut bei Patienten, die einen interventionellen koronaren Stent eingesetzt bekamen, untersucht. Für das erste Protokoll zeigte sich ein erhöhter CRP Serumwert im distalen im Gegensatz zum proximalen Blut. Im zweiten Protokoll war der

transkardiale CRP Gradient (koronarer Sinus minus peripheres Blut) nach dem „Stenting“ angestiegen, mit einem Maximum nach 48 Stunden post interventionell. Dies macht das C -reaktive Protein zu einem exzellenten Marker für Plaqueinstabilitäten oder den post -Stent Entzündungsstatus (Inoue et al. 2005). Die CRP Produktion kann dabei sowohl im Bereich der Entzündung der atherosklerotischen Läsion einer Plaque, als auch in einer koronaren arteriellen Wandverletzung durch das „Stenten“ liegen (Inoue et al. 2005).

Die Frage, ob CRP eine Aussage über eine Prognose oder über die generelle Schwere bei einem kardiovaskulären Ereignis zulässt, wurde versucht in einer Studie von Masotti klarzustellen. Dabei wurde das CRP als biochemischer Marker der Entzündung als Indikator für die Schwere von Schlaganfällen ausgewertet, indem retrospektiv die CRP Werte, 12 Stunden nach Krankenhauseinweisung, mittels nephelometrischer Methodik evaluiert wurden. Die Untersuchung der Beziehung der CRP Werte und einer Kurzzeitprognose (Mortalität in den ersten 30 Tagen, Länge des Klinikaufenthalts und physischer Grad der Behinderung/ Einschränkung), sowie der Versuch einer Langzeitprognose (Mortalität in den ersten zwölf Monaten und Re -Hospitalisation) ergab einen signifikanten statistischen Zusammenhang. Tatsächlich konnte hierbei erhoben werden, dass die Serum CRP Werte derjenigen Patienten, die in den ersten 30 Tagen nach dem Eintritt des Ereignisses verstarben, signifikant höher waren, als die Werte derjenigen Patienten die überlebten. Der Grad der bleibenden Behinderung korrelierte ebenfalls mit der Höhe der CRP Werte. Bei denjenigen Patienten, die höhere Werte hatten, waren auch höhere Inzidenzen und Re -Hospitalisationen zu erheben. Die Evaluation der CRP Werte bei Klinikeinweisung von Patienten mit kardiovaskulären Inzidenzen könnte einen negativen prognostischen Index, insbesondere für die Kurzzeitprognose darstellen (Masotti et al. 2005).

4.5 CRP Rezeptor

Die zellulären Wirkungen von CRP werden über spezifische Rezeptoren vermittelt. Lange Zeit wurde die Frage der CRP -Rezeptoren kontrovers diskutiert. Die Hypothese, dass es einen spezifischen Rezeptor für CRP (CRP -R) auf leukozytären Zellen gibt (Mortensen et al. 2000), stand der Idee gegenüber, dass es sich bei dem CRP -Rezeptor um einen Immunglobulinrezeptor handelt (Bharadwaj et al. 1999, Stein et al. 2000). Die Arbeitsgruppe um DuClos identifizierte eine der drei Isoformen des niedrigaffinen Immunglobulin-Rezeptors CD32 (FcγRIIa), als den eigentlichen hochaffinen CRP-Rezeptor. Im Gegensatz dazu wurde der hochaffine IgG-Rezeptor CD64 (FcγRI) als niedrigaffiner CRP-Rezeptor ausgemacht. Da ein Polymorphismus der Aminosäure 131 über die Bindungskonstante der Liganden/ Rezeptorinteraktion entscheidet, ist die Bindungsstelle möglicherweise in diesem Bereich lokalisiert. Zur Signaltransduktion, die auf die CRP -Bindung an FcγRIIa folgt, gibt es bislang keine Daten.

Der Verdacht auf die Existenz eines spezifischen CRP Rezeptors ist schon länger verworfen. Manolov zeigte, dass der angenommene Hauptrezeptor für das CRP, der FcγRIIa Rezeptor zwar vom CRP gebunden wird, allerdings mit einer weitaus niedrigeren Affinität als bislang angenommen. Weiterhin gelang es in seinen Untersuchungen nachzuweisen, dass die Zugabe von CRP Antikörpern die Bindungseigenschaften des CRP an diesen Rezeptor verstärken und damit zu dem Eindruck führen, als sei FcγRIIa der für das CRP hauptsächliche Rezeptor (Manolov et al. 2004).

Es ist äußerst schwierig die proatherogenen Eigenschaften des CRP im Tiermodell zu beweisen, aber die bereits in der Literatur beschriebenen Eigenschaften des CRP, wie die Bindung an das low density lipoprotein (LDL), die Aktivierung des Komplementsystems und die Interaktionen mit Monozyten und Makrophagen, geben sehr deutliche Hinweise auf eine maßgebliche, starke und eindeutige pathogenetische Eigenschaft des CRP in Hinblick auf die Atherogenese. Diese Eigenschaften des CRP leisten aller Wahrscheinlichkeit nach sogar einen aktiven eigenen Beitrag in der Rolle des Moleküls im Rahmen

der humanen Atherogenese. Darüber hinaus gibt es weitere Hinweise, dass direkte Effekte des CRP z.B. auf die arteriellen Gefäßwandzellen, die endothelialen Zellen oder die glatten Muskelzellen bestehen, wobei auch hier der molekulare Hintergrund der CRP Interaktionen mit diesen Zellen noch weitgehend ungeklärt ist (Manolov et al. 2003).

Um dem Umstand der unterschiedlich hohen CRP Basisserumwerte der Bevölkerung auf die Spur zu kommen, wurde das CRP resequenziert. Es erfolgte eine ausführliche Aufstellung der verbreiteten SNP (Single Nucleotide Polymorphism) -Varianten, die einen Zusammenhang dieser Genmutationen in Assoziation mit den Basis CRP Werten für gesunde Probanden zu zeigen versuchte. Dabei stellte sich heraus, dass vier SNPs mit erhöhten CRP Werten einhergingen und zwei andere Allele durch erniedrigte CRP Serumwerte auffielen (Miller et al. 2005).

Zur Klärung der Frage welche Interleukine außer IL -1 und IL -6 an der Induktion der CRP Transkription beteiligt sind wurde von Gabay ein Interleukin -1 Rezeptorantagonist (IL -1Ra) verwendet, der die Charakteristika eines Akute Phase Proteins aufweist. Mit diesem Modell wurde untersucht, welche Rolle IL -4 und IL -13 für die Produktion von IL -1Ra in humanen primären Hepatozyten und in HepG2 Zellen spielt. Die Zellkulturen wurden außerdem mit den Interleukinen IL -1β und /oder IL -6 kombiniert. Die Ergebnisse beweisen, dass sowohl das IL -4 als auch das IL -13 den stimulierenden Effekt von IL -1β auf die Produktion des IL -1Ra Proteins und die messenger RNA (mRNA) für die humanen primären Hepatozyten und für die HepG2 Zellen, verstärken. Ein nachfolgender Assay zeigte zudem, dass IL -4 eine Form des STAT6 DNA Komplexes mit einem STAT6 Bindungselement induzierte, was allerdings keinerlei Effekte auf die IL -1 induzierte NF -kappaB Bindungsaktivität hatte (Gabay et al. 1999). Dieses Ergebnis von Gabay kann mit der vorliegenden Arbeit bestätigt werden kann, da wir ebenfalls die Effekte von STAT6 auf die CRP Expression mittels transienten Transfektionen im Zellkulturmodell untersucht haben und für STAT6 keine, das CRP Gen induzierenden Eigenschaften, ausmachen konnten.

CRP wird in der Leber von Hepatozyten synthetisiert (Gabay et al. 1999). Die Synthese wird von Zytokinen, insbesondere von den beiden Interleukinen IL -1 und IL -6 stimuliert. Während IL -1 und IL -6 allein nur eine moderate Induktion der Genexpression hervorrufen, führt deren beider Kombination zu einer synergistischen Wirkungsverstärkung (Toniatti et al. 1990). Zahlreiche Transkriptionsfaktoren, die in die interleukinvermittelte Stimulation der CRP -Synthese involviert sind, wurden identifiziert, z.B. Mitglieder der C/EBP -Familie, insbesondere NFIL -6α (Li et al. 1996). Letzteres bindet nach Induktion an die beiden so genannten Akute Phase Responsive Elements (APREs) in der Promotorregion des CRP -Gens, die in den Regionen -250bp bis -200bp bzw. -100bp bis -30bp lokalisiert sind. Auch andere lebertypische Transkriptionsfaktoren, wie z.B. HNF -1α oder HNF -3, sind an der Regulation der CRP Promotoraktivität beteiligt (Li et al. 1996). Neuere Untersuchungen zeigen, dass p50 als Bestandteil des NFκB -Heterodimers p65 /p50 in die synergistische Wirkung von IL -1 und IL -6 involviert ist, in dem es mit der proximalen C/EBP Bindungsstelle der Promotorregion des CRP Gens interagiert (Cha -Molstad et al. 2000). Weitergehend spielen darüber hinausgehende koaktivierende Proteine eine bislang noch nicht vollständig entschlüsselte Rolle (Soutoglou et al. 2000).
Neben der transkriptionellen Regulation der CRP -Synthese existiert ein posttranskriptioneller Mechanismus, der die Freisetzung des Moleküls über eine carboxylesteraseabhängige Retention im endoplasmatischen Retikulum reguliert (Yue et al. 1993).

Die Nekrose von Gewebe ist ein starker Stimulus für die Akute Phase Reaktion und somit ist es nicht verwunderlich, dass beim Ereignis z.B. eines Myokardinfarkts eine folgerichtige massive CRP Antwort vorliegt. Aus dem Grad dieses CRP Anstiegs kann auch eine Aussage über die Größe und Schwere des Myokardinfarkts gemacht werden (de Beer et al. 1982). Der Maximalanstieg des CRP dabei ist etwa um die 48ste Stunde nach dem Beginn des Ereignisses zu finden, wobei der Grad des Anstiegs eine Aussage über die Prognose des Myokardinfarktes in Teilen ermöglicht (Pietilä et al. 1996, Ueda et al. 1996). Im Areal des akuten Myokardinfarktes sind sowohl das CRP als auch aktiviertes Komplement nachzuweisen (Kushner et al. 1963, Lagrand et al. 1997). Aus diesen Arbeiten geht ebenfalls der Verdacht hervor, dass der CRP Anstieg nicht nur das

Ausmaß des Gewebeschadens darstellt, sondern möglicherweise das CRP selbst zur Verschlechterung von Ausdehnung und Heilung einer myokardialen ischämischen Läsion beiträgt, also direkt selbst einen möglicherweise schädigenden Einfluss auf das infarzierte Gewebe ausübt (Griselli et al. 1999). Diese komplement-abhängige, proinflammatorische Wirkung des CRP ist in einem Tierversuch bewiesen worden. Dabei wurden Ratten verwendet, weil in Ratten CRP das Komplementsystem nicht zu aktivieren vermag. Während humanes CRP sowohl das humane als auch das Komplementsystem der Ratten aktiviert. Bei diesem Versuch wurden Ratten koronare Läsionen gesetzt und daraufhin die Tiere in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe bekam menschliches CRP injiziert, die andere wurde mit einer Pufferlösung oder im Vergleich mit humanem SAP, einem Protein ebenfalls wie das CRP aus der Pentraxinfamilie behandelt, von dem bekannt ist, dass es das Komplementsystem nicht aktiviert. Dieser Versuch zeigte eindeutig, dass die mit humanem CRP behandelten Ratten deutlich kränker waren und schwerwiegendere Schäden ihrer koronaren Läsionen davontrugen, als die aus der Vergleichsgruppe stammenden Tiere (Griselli et al. 1999). Ein Teil der mit humanem CRP behandelten Ratten verstarb sogar signifikant häufiger. Bei den Überlebenden wurden am fünften Tag, nachdem die Läsion gesetzt wurde, Sektionen vorgenommen die ergaben, dass bei den mit humanem CRP behandelten Ratten 40% größere Infarktareale vorlagen, als bei den unbehandelten oder mit humanem SAP behandelten Ratten der vergleichenden Kontrollgruppe. Injektionen von humanem CRP in gesunde, unbehandelte Ratten hatten dagegen keinen negativen Einfluss auf deren Gesundheitszustand. Diese dramatische Verschlechterung des Infarktausmaßes durch das CRP wurde noch durch eine weitere Untersuchung gestützt, in dem die maßgebliche Abhängigkeit des CRP vom Komplement gezeigt wurde. Durch die Zugabe des Gifts der Kobra, welches bekanntermaßen das Komplementsystem inaktiviert, konnte bei dem oben gezeigten Versuchsaufbau bewiesen werden, dass die Ausweitung der Läsion durch CRP eindeutig komplementabhängig ist (Griselli et al. 1999). Dieses Rattenmyokardinfarktmodell ist der erste direkte Beweis für die schädigende Wirkung des CRP, dessen proinflammatorische Eigenschaften durch Bindung von Liganden an Zelloberflächen und anderen autologen Strukturen als Ergebnis einer Entzündung, einer Infektion, einer Ischämie oder anderer pathologischer Prozesse, wie Gewebeschaden von statten geht. Die Komplementaktivierung

spielt dabei eine offensichtliche maßgebliche Rolle, das Ausmaß des Gewebeschadens und die Verschlechterung der Erkrankung betreffend.
Einen Zusammenhang mit der Entstehung kardiovaskulärer Ereignisse aufzuzeigen ist damit aber noch nicht gelungen. CRP ist nach bisherigem Stand der Forschung nicht nur ein Marker für das Vorliegen von Pathologika, sondern es nimmt sehr wahrscheinlich auch aktiv und selbst an der Pathogenese der Atherogenese teil. Mittels der Höhe seines Wertes gelingen erste Ansätze für Prognosen zur Schwere, Progression und dem Ausmaß einer kardiovaskulären Erkrankung. Eine zweifelsfreie Klärung dieses Sachverhaltes und in diesem Zusammenhang auch die genaue Rolle des CRP in der Pathogenese der Atherogenese wird nur durch die Entwicklung eines Medikamentes möglich sein, welches spezifisch die Bindung von CRP an Zellen und somit seine Effekte wie seine proinflammatorischen Wirkungen in vivo inhibiert können wird (Pepys 1999). Nur so kann die Frage geklärt werden, ob CRP den Prozess der Atherosklerose in Gang bringt, unterstützend auf die Progression bereits bestehender atherosklerotischer Läsionen einwirkt oder gar in dieser Frage keine maßgebliche Rolle spielt. Inhibitorische Pharmaka die auf die CRP Bindung einen hemmenden Einfluss auszuüben vermögen könnten, bei einer erfolgreichen Entwicklung, bei bewiesenem pathogenetischen Einfluss des CRP möglicherweise kardioprotektiv wirken und in der Folge die Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen, wie z.B. von Myokardinfarkten reduzieren, einschränken oder im besten Falle sogar verhindern.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, mit einem geeigneten Zellkulturmodell die Möglichkeiten in Richtung einer Inhibition und damit der therapeutisch nutzbaren Hemmung der hepatozytären CRP -Synthese aufzuzeigen. Ebenso wurde mit dem erstellten Zellkulturmodell ein Beitrag zur Identifizierung der CRP Bindungsstelle am Genort geliefert, welches dem zweiten möglichen therapeutischen Ziel, der Entwicklung eines CRP Rezeptor Blockers dienen soll.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Fragestellung, ob sich das C-reaktive Protein (CRP), welches sich in der Vergangenheit als ein wirksamer kardiovaskulärer Risikomarker herausgestellt hat, als Targetmolekül für die Primär- bzw. Sekundärprävention der Atherosklerose eignet.

Die vorliegende Arbeit gibt diesbezüglich Antworten auf die Frage nach der Bedeutung der Transkriptionsfaktoren, die für die Expression von CRP in humanen Leberzellen eine maßgebliche Rolle spielen, und darüber hinaus in wie weit diese eine mögliche akzelerierende Wirkung auf die Atherogenese haben könnten. Dazu wurden vorbereitend, modellhaft, humane Hepatom (Hep) G2-Zellen mittels transienten Transfektionen, mit dem 1 kb (Kilo Base) großen CRP Promotor und verschiedenen Transkriptionsfaktoren der Klasse „Signal Transducer and Activator of Transcription 3“ (STAT3) transfiziert. Anschließend wurden die behandelten Zellen mit CRP expressionfördernden Zytokinen wie Interleukin-1β (IL-1β) und Interleukin 6 (IL-6), sowie mit einem Aktivator des Protein Kinase C Pathways (PKC), dem 4α-Phorbol-12,13-Dibutyrat (PDBu) stimuliert.

Es stellte sich im Rahmen der transienten Transfektionsexperimente die deutlichste Rolle für das STAT3 in Hinblick auf eine Steigerung der CRP Promotoraktivität heraus (Faktor 11,1 ± 1,2). In der vorliegenden Arbeit wurde somit zunächst das einflussreichste STAT identifiziert um anschließend in einer modellhaften Untersuchung seinen Einfluss auf CRP Promotoraktivität zu entschlüsseln. Zusätzlich wurde der PKC Pathway in diese Arbeit eingebracht und untersucht, der einen weiteren und wichtigen Signalweg bei der CRP Expression darstellt.

Mit diesem Teilergebnis wurde, als Ziel dieser Arbeit, aus HepG2 Zellen ein Zellkulturmodell entwickelt, welches sich durch eine stabile Kotransfektion des CRP Promotors und des zuvor untersuchten Transkriptionsfaktors STAT3 auszeichnet. Dieses Modell soll helfen die Frage nach dem genauen Einfluss des STAT3 im Vergleich zu einer anderen Zelllinie, den verwandten ABEK 14 Zellen (Eigenname), die nur den CRP Promotor und kein STAT3 tragen, zu erörtern.

Bei der direkten Gegenüberstellung der beiden Zelllinien zeigt sich, dass STAT3 einen signifikanten Anteil an der Steigerung der CRP Expression für das

Interleukin-1β hat und sich hierbei die stabile STAT3 Transfektion mit einer Erhöhung der CRP Promotoraktivität um den Faktor 2,5 auszeichnet.
Für das Interleukin-6 konnte kein ähnlicher Effekt gezeigt werden und auch die Kombination der beiden Interleukine zeigte im Vergleich des Stimulationsverhaltens der beiden Zelllinien keine signifikanten Unterschiede.
Der zusätzlich untersuchte PKC Pathway war mit Hilfe von PDBu bei den ABEK14 Zellen, die den Transkriptionsfaktor STAT3 nicht tragen, stärker ausgeprägt als in dem neuen Zellkulturmodell.
Auch die Kombination aller drei Stimulantien zeigte – wohl auf Grund des stärken Stimulierungsverhaltens der ABEK14 Zellen für den PKC Pathway – keine Aktivitätssteigerung des CRP Promotors für die STAT3 Zelllinie.
Diese Ergebnisse verleihen dem in dieser Arbeit entstandenem Zellkulturmodell mit einer stabilen Transfektion des CRP Promotors und des STAT3 einen idealen Beispielcharakter im Hinblick auf Untersuchungen zur Identifikation von Inhibitoren der CRP Synthese. Ein zusätzlicher Vorteil, des Zellkulturmodells, ist seine sehr einfache, schnelle und quantitative Auswertbarkeit über den Luciferase Reportergen Assay, der eine einfach zu handhabende und genaue Angabe über die CRP Promotoraktivität im Stimulierungsverhalten verschiedenster Reagenzien erlaubt.

Fernziel der Ergebnisse dieser Arbeit ist es, mit Hilfe des erstellten Zellkulturmodells, therapeutisch nutzbare CRP Transkriptionsinhibitoren, möglicherweise im Rahmen eines High Throughput Screenings (HTS), zu identifizieren, da eine Vielzahl von Hinweise in der Literatur darauf hin deuten, dass die Reduktion von CRP Plasmaleveln zu einer Reduzierung der Atherogenese und damit langfristig zu einer Abnahme bei den Inzidenzen von kardiovaskulären Erkrankungen wie Myokardinfarkten oder Schlaganfällen führt.

Diesbezügliche Versuche zur Identifikation von pharmakologischen Inhibitoren des CRP Promotors anhand des erstellten Zellkulturmodells werden in Kooperation mit kommerziellen Pharmaunternehmen erfolgen.

6. Literaturverzeichnis

1. Agrawal A, Cha-Molstad H, Samols D, Kushner I: Overexpressed nuclear factor-kappaB can participate in endogenous C-reactive protein induction, and enhances the effects of C/EBPbeta and signal transducer and activator of transcription-3. Immunology 108: 539-547 (2003)
2. Arnaud C, Burger F, Steffens S, Veillard NR, Nguyen TH, Trono D, Mach F: Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes: new evidence for direct antiinflammatory effects of statins. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 1231-1236 (2005)
3. Baltz ML, de Beer FC, Feinstein A, Munn EA, Milstein CP, Fletcher TC, March JF, Taylor J, Bruton C, Clamp JR, Davies AJ, Pepys MB: Phylogenetic aspects of C-reactive protein and related proteins. Ann N Y Acad Sci 389: 49-75 (1982)
4. Berk BC, Weintraub WS, Alexander RW: Elevation of C-reactive protein in "active" coronary artery disease. Am J Cardiol 65: 168-172 (1990)
5. Bhadki S, Torzewski M, Klouche M, Hemmes M: Complement and Atherogenesis: Binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 2348-2354 (1999)
6. Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, DuClos TW: The major receptor for C-reactive protein on leucocytes is fc-gamma receptor II. J Exp Med 190: 585-590 (1999)
7. Cermak J, Key NS, Bach RR, Balla J, Jacob HS, Vercellotti GM: C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. Blood 82: 513-520 (1993)
8. Cha- Molstad H, Agrawal A, Zhang D, Samols D, Kushner I: The Rel family member P50 mediated cytokine-induced C-reactive protein expression by a novel mechanism. J Immunol 165: 4592-4597 (2000)
9. Chambers JC, Eda S, Bassett P, Karim Y, Thompson SG, Gallimore JR, Pepys MB, Kooner JS: C-reactive protein, insulin resistance, central obesity, and coronary heart disease risk in Indian Asians from the United Kingdom compared with European whites. Circulation 104: 145-150 (2001)

10. Chang MK, Binder CJ, Torzewski M, Witztum JL: C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. Proc Nat Acad Sci 99: 13043-13048 (2002)
11. Cushman M, Legault C, Barrett -Connor E, Stefanick ML, Kessler C, Judd HL, Sakkinen PA, Tracy RP: Effect of postmenopausal hormones on inflammation -sensitive proteins: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Study. Circulation 100: 717-722 (1999)
12. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R: Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease. J Amer Coll Cardiol 279: 1477-1482 (1998)
13. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, Gallimore JR, Pepys MB: Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. Brit Med J 321: 199-204 (2000)
14. Danesh, J, Muir J, Wong YK, Ward M, Gallimore JR, Pepys MB: Risk factors for coronary heart disease and acute-phase proteins. A population-based study. Europ Heart J 20: 954-959 (1999)
15. de Beer FC, Hind CR, Fox KM, Allan RM, Maseri A, Pepys MB: Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction. Brit Heart J 47: 239-243 (1982)
16. de Beer FC, Soutar AK, Baltz ML, Trayner IM, Feinstein A, Pepys MB: Low density and very low density lipoproteins are selectively bound by aggregated C-reactive protein. J Exp Med 156: 230-242 (1982)
17. Depraetere S, Willems J, Joniau M: Stimulation of CRP secretion in HepG2 cells: cooperative effect of dexamethasone and interleukin 6. Agents Actions 34: 369-375 (1991)
18. Ford ES: Does exercise reduce inflammation? Physical activity and C-reactive protein among U.S. adults. Epidemiology 13: 561-568 (2002)
19. Freeman DJ, Norrie J, Caslake MJ, Gaw A, Ford I, Lowe GD, O'Reilly DS, Packard CJ, Sattar N, West of Scotland Coronary Prevention Study: C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. Diabetes 51: 1596-1600 (2002)

20. French JE: Atherosclerosis in relation to the structure and function of the arterial intima, with special reference to the endothelium. Int Rev Exp Path 5: 253-353 (1966)
21. Fröhlich M, Döring A, Imhof A, Hutchinson WL, Pepys MB, Koenig W: Oral contraceptive use is associated with a systemic acute phase response. Fibrinol Proteol 13: 239-244 (1999)
22. Fröhlich M, Imhof A, Berg G, Hutchinson WL, Pepys MB, Boeing H, Muche R, Brenner H, Koenig W: Association between C -reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population -based study. Diabetes Care 23: 1835-1839 (2000)
23. Gabay C, Kushner I: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. New Engl J Med 340: 448-454 (1999)
24. Gabay C, Porter B, Guenette D, Billir B, Arend WP: Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 enhance the effect of IL-1beta on production of IL-1 receptor antagonist by human primary hepatocytes and hepatoma HepG2 cells: differential effect on C-reactive protein production. Blood 93: 1299-1307 (1999)
25. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ: Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. New Engl J Med 316: 1371-1375 (1987)
26. Griselli M, Herbert J, Hutchinson WL, Taylor KM, Sohail M, Krausz T, Pepys MB: C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. J Exp Med 190: 1733-1739 (1999)
27. Harnett W, Harnett MM: Phosphorylcholine: Friend or foe of the immune system? Immunol Today 20: 125-129 (1999)
28. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB: Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. Lancet 349: 462-466 (1997)
29. Hutchinson WL, Koenig W, Frohlich M, Sund M, Lowe GD, Pepys MB: Immunoradiometric assay of circulating C-reactive protein: Age-related values in the adult general population. Clin Chem 46: 934-938 (2000)

30. Imhof A, Froehlich M, Brenner H, Boeing H, Pepys MB, Koenig W: Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. Lancet 357: 763-767 (2001)
31. Inoue T, Kato T, Uchida T, Sakuma M, Nakajima A, Shibazaki M, Imoto Y, Saito M, Hashimoto S, Hikichi Y, Node K: Local release of C-reactive protein from vulnerable plaque or coronary arterial wall injured by stenting. J Amer Coll Cardiol: 46: 239-245 (2005)
32. Ivashchenko Y, Kramer F, Schafer S, Bucher A, Veit K, Hombach V, Busch A, Ritzeler O, Dedio J, Torzewski J: Protein kinase C pathway is involved in transcriptional regulation of C-reactive protein synthesis in human hepatocytes. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 186-192 (2005)
33. Koenig W, Sund M, Frohlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A, Hutchinson WL, Pepys MB: C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle - aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. Circulation 99: 237-242 (1999)
34. Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, Meilahn EN: Relation of C -reactive protein and coronary heart-disease in the MRFIT nested case control study. Amer J Epidemiol 144: 537-547 (1996)
35. Kushner I, Rakita L, Kaplan MH: Studies of acute phase protein. II. Localization of C-reactive protein in heart in induced myocardial infarction in rabbits. J Clin Invest 42: 286-292 (1963)
36. Lagrand WK, Niessen HW, Wolbink GJ, Jaspars LH, Visser CA, Verheugt FW, Meijer CJ, Hack CE: C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction. Circulation 95: 97-103 (1997)
37. Li SP, Goldman ND: Regulation of human C-reactive protein expression by two synergistic IL-6-responsive elements. Biochemistry 35: 9060-9068 (1996)
38. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuzzi AG, Pepys MB, Maseri A: The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. New Engl J Med 331: 417-424 (1994)

39. Manolov DE, Koenig W, Hombach V, Torzewski J: C-reactive protein and atherosclerosis. Is there a causal link? Histol Histopathol 18: 1189-1193 (2003)
40. Manolov DE, Rocker C, Hombach V, Nienhaus GU, Torzewski J: Ultrasensitive confocal fluorescence microscopy of C-reactive protein interacting with FcgammaRIIa. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24: 2372-2377 (2004)
41. Masotti L, Ceccarelli E, Forconi S, Cappelli R: Prognostic role of C-reactive protein in very old patients with acute ischaemic stroke. J Int Med 258: 145-152 (2005)
42. McCarty MF: AMPK activation may suppress hepatic production of C-reactive protein by stimulating nitric oxide synthase. Med Hypotheses 63: 328-333 (2004)
43. McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Liang L, Reaven G, Schaaf P, Reaven P: Differentiation between obesity and insulin resistance in the association with C-reactive protein. Circulation 106: 2908-2912 (2002)
44. Miller DT, Zee RY, Suk Danik J, Kozlowski P, Chasman DI, Lazarus R, Cook NR, Ridker PM, Kwiatkowski DJ: Association of common CRP gene variants with CRP levels and cardiovascular events. Ann Hum Genet 69: 623-638 (2005)
45. Mold C, Gewurz H, Du Clos TW: Regulation of complement activation by C-reactive protein. Immunopharmacology 42: 23-30 (1999)
46. Mortensen RF, Thong W: Regulation of phagocytic leukocyte activities by C-reactive protein. J Leukoc Biol 67: 495-500 (2000)
47. Ochrietor JD, Harrison KA, Zahedi K, Mortensen RF: Role of STAT3 and C/EBP in cytokine -dependent expression of the mouse serum amyloid P-component (SAP) and C-reactive protein (CRP) genes. Cytokine 12: 888-899 (2000)
48. Pepys MB, Baltz ML: Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. Advanc Immunol 34: 141-212 (1983)
49. Pepys MB, Hirschfield GM: C-reactive protein: a critical update. J Clin Invest 111: 1805-1812 (2003)

50. Pepys MB, Rowe IF, Baltz ML: C-reactive protein: binding to lipids and lipoproteins. Int Rev Exp Path 27: 83-111 (1985)
51. Pepys MB: The Lumleian Lecture. C-reactive protein and amyloidosis: From proteins to drugs? In Horizons in medicine. Volume 10. Williams G, editor. Royal College of Physicians of London. London, United Kingdom: 397-414 (1999)
52. Pietilä KO, Harmoinen AP, Jokiniitty J, Pasternack AI: Serum C-reactive protein concentration in acute myocardial infarction and its relationship to mortality during 24 months of follow -up in patients under thrombolytic treatment. Europ Heart J 17: 1345-1349 (1996)
53. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH: Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. New Engl J Med 336: 973-979 (1997)
54. Ridker PM, Hennekens CH, Rifai N, Buring JE, Manson JE: Hormone replacement therapy and increased plasma concentration of C-reactive protein. Circulation 100: 713-716 (1999)
55. Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, Gotto AM Jr; Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study Investigators: Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. New Engl J Med 344: 1959-1965 (2001)
56. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E: Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. Circulation 100: 230-235 (1999)
57. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moye LA, Goldman S, Flaker GC, Braunwald E: Inflammation, pravastatin and risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Circulation 98: 839-844 (1998)
58. Riede UN, Muentefering H, Drexler H, Ihling C, Schaefer HE: Kardiovaskuläres System. In: Riede UN, Schaefer HE (Hrsg): Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 435-523 (1995)

59. Rieger H, Greten H, Sinzinger H, Standl E, Windler E: Arteriosklerose. In: Rieger H, Schoop W (Hrsg): Klinische Angiologie. Springer Verlag Heidelberg, S. 34-74 (1998)
60. Rokitansky Carl: A Manual of Pathological Anatomy. New Sydenham Society, 1849-1854, 4 volumes Edward, London, United Kingdom (1849)
61. Ross R, Glomset JA: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle cell is a key event in the genesis of the lesion of atherosclerosis. Science 180: 1332-1339 (1973)
62. Ross R: Atherosclerosis - an inflammatory disease. New Engl J Med 340: 115-126 (1999)
63. Shine B, de Beer FC, Pepys MB: Solid phase radioimmunoassays for C-reactive protein. Clin Chim Acta 117: 13-23 (1981)
64. Smith JW, McDonald TL: Production of serum amyloid A and C-reactive protein by HepG2 cells stimulated with combinations of cytokines or monocyte conditioned media: the effects of prednisolone. Clin Exp Immunol 90: 293-299 (1992)
65. Soutoglou E, Papafotiou G, Katrakili N, Talianidis I: Transcriptional activation by hepatocyte nuclear factor-1 requires synergism between multiple coactivator proteins. J Biol Chem 275: 12515-12520 (2000)
66. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Richardson M, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerotic-prone regions. Circulation 85: 391-405 (1992)
67. Stary HC: Changes In components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries. Basic Res Cardiol 89: 17-32 (1994)
68. Stary HC: The histological classification of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ: Atherosclerotic and Coronary Artery Disease. Lippincott Raven Publishers Philadelphia, Philadelphia, PA, USA, S. 463-474 (1996)
69. Stein PM, Edberg JC, Kimberly RP, Mangan EK, Bharadwy D, Mold C, Du Clos TW: C-reactive protein binding to FCγRIIa on human monocytes is allele-specific. J Clin Invest 105: 369-376 (2000)

70. Szalai AJ, McCrory MA, Cooper GS, Wu J, Kimberly RP: Association between baseline levels of C-reactive protein (CRP) and a dinucleotide repeat polymorphism in the intron of the CRP gene. Genes Immunol 3: 14-19 (2002)
71. Szalai AJ, van Ginkel FW, Wang Y, McGhee JR, Volanakis JE: Complement-dependent acute -phase expression of C-reactive protein and serum amyloid P-component. J Immunol 2000 165: 1030-1035 (2000)
72. Thompson D, Pepys MB, Wood SP: The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. Structure 7: 169-177 (1999)
73. Toniatti C, Demartis A, Monaci P, Nicosia A, Ciliberto G: Synergistic transactivation of the human C -reactive protein promoter by transcription factor HNF-1 binding at two distinct sites. Europ Molec Biol Org J 13: 4467-4475 (1990)
74. Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Frohlich M, Koenig W, Waltenberger J, Fitzsimmons C, Hombach V: C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. Arterioscler Thromb Vasc Biol 18: 1386-1392 (1998)
75. Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J, Koenig W, Schmitz G, Hombach V, Torzewski J: C-reactive protein in the arterial intima; role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20: 2094-2099 (2000)
76. Torzewski M, Torzewski J, Bowyer DE, Waltenberger J, Fitzsimmons C, Hombach V, Gabbert HE: Immunohistochemical colocalization of the terminal complement complex of human complement and smooth muscle cell α-actin in early atherosclerotic lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17: 2448-2452 (1997)
77. Tracy RP, Kuller LH, Psaty BM, Cushman M, Meilahn EN, Smith N: C-reactive protein and incidence of cardiovascular disease in older women: the rural health promotion project and the cardiovascular health study. Circulation 93: 622 (1996)

78. Ueda S, Ikeda U, Yamamoto K, Takahashi M, Nishinaga M, Nago N, Shimada K: C-reactive protein as a predictor of cardiac rupture after acute myocardial infarction. Amer Heart J 131: 857-860 (1996)
79. Vainas T, Stassen FR, de Graaf R, Twiss EL, Herngreen SB, Welten RJ, van den Akker LH, van Dieijen -Visser MP, Bruggeman CA, Kitslaar PJ: C-reactive protein in peripheral arterial disease: relation to severity of the disease and to future cardiovascular events. J Vasc Surg 42: 243-251 (2005)
80. Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN: Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. J Clin Invest 91: 1351-1357 (1993)
81. Virchow R: Phlogose und Thrombose im Gefäßsystem. In: Virchow R, Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin, S. 458-564 Meidinger Sohn, Berlin, Frankfurt am Main (1856)
82. Volanakis JE: Complement activation by C-reactive protein complexes. Ann N Y Acad Sci 389: 235-250 (1982)
83. Voleti B, Agrawal A: Regulation of basal and induced expression of C-reactive protein through an overlapping element for OCT-1 and NF-kappaB on the proximal promoter. J Immunol 175: 3386 -3390 (2005)
84. Wolbink GJ, Brouwer MC, Buysmann S, Ten B, Hack CE: CRP-mediated activation of complement in vivo: assessment by measuring circulating complement C-reactive-protein complexes. J Immunol 157: 473-479 (1996)
85. World Health Organization: Classification of atherosclerotic lesions. WHO Tech Rep Serv 143: 1-20 (1985)
86. Yudkin JS, Stehouwer CDA, Emeis JJ, Coppack SW: C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction. A potential role for cytokines originating from adipose tissue? Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 972-978 (1999)
87. Yue CC, Muller -Greven J, Dailey P, Lozanski G, Anderson V, Macintyre S: Identification of a C-reactive protein binding site in two hepatic carboxylesterases capable of retaining C-reactive protein within the endoplasmatic reticulum. J Biol Chem 268: 10007-10016 (1993)
88. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G: Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events

in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. New Engl J Med 342: 145-153 (2000)

89. Zhang D, Sun M, Samols D, Kushner I: STAT3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6. J Biol Chem 271: 9503-9509 (1996)
90. Zhang YX, Cliff WJ, Schoefl GI, Higgins G: Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis. Atherosclerosis 145: 375-379 (1999)
91. Zhong W, Zen Q, Tebo J, Schlottmann K, Coggeshall M, Mortensen RF: Effect of human C-reactive protein on chemokine and chemotactic factor-induced neutrophil chemotaxis and signalling. J Immunol 161: 2533-2540 (1998)
92. Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J: C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. Circulation 103: 1194-1197 (2001)

8. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. V. Hombach für seine freundliche Unterstützung und Ermöglichung der Erstellung dieser Arbeit. Ich bedanke mich dafür, dass er die finanziellen Mittel und die nötigen Laborräume für die Durchführung der Experimente dieser Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereiches (SFB) 451 („Läsionen und Reparationen am kardiovaskulären System“) zur Verfügung gestellt hat.

Mein sehr herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. med., M. phil. Jan Torzewski, der mich über meinen gesamten Weg des Promotionsverfahren immer tatkräftig unterstützt hat und mir stets hilfsbereit, innovativ und ideenreich zur Seite stand, sowie immer ein offenes Ohr für alle meine Probleme und Fragen hatte, die sich über die Zeit ergaben. Auch danke ich ihm für die Ermöglichung dieser Arbeit durch die Überlassung des Themas und das Zurverfügungstellen der notwendigen Räumlichkeiten und finanziellen Mittel.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Frau M. Bienek und Frau Dr. biol. hum. Juliane Wiehe und Herrn Dr. biol. hum. Dimitar Manolov und speziell bei Frau Andrea Bucher, für ihre immerzu hilfsbereite Betreuung, für die Einführung in die Labortätigkeit und praktische Tätigkeit der Zellkultur, ihre unermüdliche Unterstützung und ihre stete Hilfsbereitschaft bei den experimentellen Arbeiten.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne die ich nicht die Möglichkeit zum Studium und meinem Werdegang gehabt hätte.

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Name, Vorname	Fox, Henrik
Geburtsdatum	02.02.1980
Geburtsort	Frechen, Deutschland
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

AUSBILDUNG

09/1986 – 07/1990	Grundschule, GHS Laichingen
08/1990 – 06/1999	Albert Schweitzer Gymnasium Laichingen
07/1999 – 09/2000	Zivildienst, Rettungsdienst, Deutsches Rotes Kreuz Kreis Verband Ulm Ausbildung zum Rettungssanitäter, ehrenamtliche Tätigkeit bis heute
seit 10/2000	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm und der Tufts University in Boston, MA, USA
10/2002	**Physikum**
10/2003	**1. Staatsexamen**
10/2005	**2. Staatsexamen**
ca. 11/2006	**3. Staatsexamen**

WISSENSCHAFTLICHE UND PRAKTISCHE ERFAHRUNG

Famulaturen	Innere Medizin, Kardiologie und Intensivmedizin (12 Wochen) am Universitätsklinikum Ulm, Innere Medizin II, Leitung: Prof. Dr. V. Hombach Anästhesie am Universitätsklinikum Ulm, Leitung: Prof. Dr. Dr. M. Georgieff Radiologie: Dr. Palmbach Ulm, Hausärztliche Praxis: Dr. Eisinger, Blaubeuren
10/2005 – 09/2006	Praktisches Jahr in der Universitätsklinik für Anästhesiologie der Universität Ulm, Universitätsklinik für Innere Medizin II der Universität Ulm (Kadiologie) und an der TUFTS University, Medical School, New England Medical Center in Boston, MA, U.S.A.
03/2004 – 09/2006	studienbegleidende, wissenschaftliche Tätigkeit im Rahmen der Morbus Hodgkin Studie der Deutschen Hodgkin Lymphom Studiengruppe der Universität zu Köln, Leitung: Prof. Dr. med. V. Diehl

PROMOTION

seit 09/2003	Experimentelle Doktorarbeit im Rahmen des SFB 451 mit dem Thema „Untersuchungen zur Rolle des Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 3 bei der transkriptionellen Regulation der Synthese des C-reaktiven Proteins“, Innere Medizin II, Universitätsklinikum Ulm, in der AG Prof. Dr. med. J. Torzewski, MPhil