

Universitätsklinikum Ulm  
Zentrum für Innere Medizin  
Klinik für Innere Medizin II  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. V. Hombach

**C-reaktives Protein und Atherogenese – Untersuchungen  
zur Synthesehemmung des C-reaktiven Proteins mit dem  
Pilzmetaboliten Galiellalacton**

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

vorgelegt von

Gabriele Helena Klis

aus

München

2009

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

I. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Jan Torzewski

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Martin Hoffmann

Tag der Promotion: 12. Februar 2010

Meinen Eltern gewidmet

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>II</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Arteriosklerose: Begriffsbestimmung und Pathophysiologie .....	1
1.2 C-reaktives Protein .....	4
1.3 Reduktion der proatherogenen Effekte von CRP.....	9
1.4 CRP-Synthese .....	9
1.5 Galactose .....	13
1.6 Fragestellung .....	14
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1 Material.....	16
2.2 Methoden.....	23
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1 Versuchsergebnisse zu PKH .....	37
3.2 Versuchsergebnisse zu HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2- p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase...	43
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>58</b>
4.1 Wahl eines entsprechenden Tier- und Zellkulturmodells .....	58
4.2 Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen .....	59
4.3 Grenzen der Arbeit.....	64
4.4 Ausblick .....	65
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>68</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>70</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>85</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	Activator Protein-1
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic Acid (Bicinchoninsäure)
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
CD	Cluster of Differentiation
C/EBP $\beta$	CCAAT-box/Enhancer Binding Protein
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives Protein
C5b-9	Komplementkomponenten C5b-C9
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelzelle
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
FC	Foam Cell (Schaumzelle)
FCS	Fetal Calf Serum

## Abkürzungsverzeichnis

---

fl	full length (volle Länge <i>hier: des CRP-Promoters</i> )
Gal	Galiellalacton
GDP	Guanosindiphosphat
gp	Glycoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
HepG2-Zellen	Hepatomzelllinie G2
HNF	Hepatocyte Nuclear Factor
HRP	Horse Radish Peroxidase
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IC <sub>50</sub>	Halbmaximale Hemmkonzentration
IFIT-2	Interferon-induced Protein with Tetratricopeptide Repeats-2
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Media
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
JAK	Janus Kinase
kD	kiloDalton
LDL	Low density lipoprotein
MAC	Membran Angriffs Komplex
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MEK	Mitogen-dependent Erk Kinase

## Abkürzungsverzeichnis

---

MP	Makrophage
MZ	Monozyt
NF-AT	Nuclear Factor of activated T-cells
NFIL-6 $\alpha$	Nuclear Factor IL-6 $\alpha$
nF- $\kappa$ B	Nuclear Factor $\kappa$ B
ns	nicht signifikant
NT	Not treated (unbehandelt)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
ox-LDL	Oxidiertes Low density lipoprotein
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PKH	Primäre Kaninchenhepatozyten
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
PSG	Penicillin/Streptomycin/Glutamin
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline
TMB	Tetramethylbenzidin
U	Umdrehungen
VCAM	Vascular Adhesion Molecule
WHHL	Watanabe heritable hyperlipidemic

## 1. Einleitung

### ***1.1 Arteriosklerose: Begriffsbestimmung und Pathophysiologie***

#### **1.1.1 Definition**

Die Arteriosklerose ist die häufigste Erkrankung der Arterien, die mit einer krankhaften Veränderung der Arterien im Sinne einer Verhärtung und Verdickung einhergeht, was schließlich zum Elastizitätsverlust und zu einer Lumeneinengung der Gefäße führt. Da die Begriffe Atherosklerose und Arteriosklerose oft einheitlich gebraucht werden, soll an dieser Stelle eine kurze Definition erfolgen. Die Arteriosklerose umfasst genau genommen drei Krankheitsbilder:

- die Atherosklerose als Erkrankung der elastischen sowie der großen und mittleren muskulären Arterien mit Ablagerungen in der Intima
- die Mönckeberg-Mediaverkalkung mit Kalkablagerungen in der Media mittlerer Arterien
- die Arteriolosklerose als Erkrankung der kleinen Arterien und Arteriolen (Böcker et al. 2004)

Die klinisch größte Bedeutung kommt der Atherosklerose zu. Die Definition der World Health Organisation von 1958 beschreibt diese als „variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ (Böcker et al. 1998, S. 484). Diese systemische Erkrankung nimmt einen chronisch progredienten Verlauf, wobei das ausgeprägte Bild der Atherosklerose sich mit zunehmendem Alter manifestiert. Klinisch bemerkbar machen sich hierbei die Folgeerkrankungen der Atherosklerose: An den Extremitäten führt sie zur peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK), am Herzen zur koronaren Herzkrankheit mit der Folge von Herzinfarkt und Angina pectoris und im Gehirn zu cerebrovaskulären Insulten. Sie stellt somit eine der Haupttodesursachen in den westlichen Industrienationen dar (Sabouret et al. 2008). Risikofaktoren hierbei sind Nikotinkonsum, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Alter und genetische Prädisposition (Bhargava 2003).



### 1.1.2 Pathophysiologie und Mechanismen zur Entstehung der Atherosklerose

Die genaue Entstehung der Atherosklerose ist seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung und konnte bis dato nicht vollständig geklärt werden. Konsens besteht darüber, dass es sich um einen entzündlichen Prozess mit Beteiligung von Endothelzellen, Leukozyten, glatten Muskelzellen und dem Immunsystem handelt (Hansson 1993, Falk 2006). Zu Abläufen und Ursachen der Atherogenese gab es in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Hypothesen.

So erklärten sich E.P. und J.M. Benditt, sowie auch G.M. Martin und C.A. Sprague 1973 die atherosklerotische Läsion als Resultat einer klonalen Proliferation glatter Muskelzellen (Benditt u. Benditt 1973, Martin u. Sprague, 1972).

Eine weitere wichtige Theorie zur Pathogenese ist die „Response to injury“-Hypothese, die im Jahr 1973 von Ross R. et al. postuliert wurde. Demnach stellt eine Verletzung des Endothels durch mechanische, chemische oder immunologische Reize den Ausgangspunkt für immunologische und proliferative Vorgänge in der Arterienwand dar. Durch Einwanderung von Monozyten, Plasmabestandteilen und Ausschüttung bestimmter Faktoren kommt es hierbei zur Migration und Proliferation glatter Muskelzellen. Außerdem wird vermehrt extrazelluläre Matrix produziert und es werden Lipide eingelagert (Ross et al. 1977). Die These wurde im Lauf der Jahre so modifiziert, dass nicht nur Endothelläsionen sondern Endotheldysfunktionen jeder Art zur Atherogenese führen können (Ross 1995). Auslöser hierbei können die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren aber auch bakterielle, virale und immunologische Stimuli sein. Für die Pathogenese der Atherogenese bedeutsame Folge sind gesteigerte Permeabilität des Endothels für low density lipoprotein (LDL), Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten und die gestörte Sekretion von Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen und Zytokinen (Ross 1999, Falk 2006). Wissenschaftlich anerkannt ist mittlerweile auch die Erkenntnis, dass dem LDL eine Hauptbeteiligung an der Atherogenese zukommt (Ross 1999, Bhakdi et al. 1995, Goldstein u. Brown 1977). In der Intima aufgenommenes LDL wird von Endothelzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen oxidiert (Berliner u. Heinecke 1996). Oxidiertes LDL (ox-LDL) induziert zahlreiche in der Gefäßwand

ablaufende Prozesse. Unter anderem kommt es zur Aktivierung von Thrombozyten, Rekrutierung von Monozyten, Steigerung der Interleukinsynthese, Stimulation von Monozyten und Endothelzellen zur Produktion von tissue factor, Stimulation der Transkription an der Atherogenese beteiligter Gene, Formation und Verkalkung des entstehenden Thrombus (Berliner u. Heinecke 1996, Akkerman 2008).

Zudem wird ox-LDL von an der Oberfläche von Makrophagen lokalisierten Rezeptoren, so genannten Scavengerrezeptoren aufgenommen (Brown u. Goldstein 1990). Diese wurden erstmals von Goldstein et al. bei Untersuchungen zu Cholesterinablagerungen in atherosklerotischen Läsionen bei Patienten mit defektem LDL-Rezeptor beschrieben (Goldstein et al. 1979). Als molekulare Bestandteile dieser Rezeptoren wurden Cluster of Differentiation (CD)-36-Moleküle identifiziert, die über eine Signalkaskade schließlich die Bildung von Schaumzellen induzieren (Rahaman et al. 2006). Des Weiteren kommt es zur Sekretion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anderen Mediatoren, die zur Proliferation von Kollagen und glatten Muskelzellen führen und eine weitere Oxidation von LDL bedingen (Brown u. Goldstein 1990). Zusammen mit T-Lymphozyten bilden sich „fatty streaks“ – Fettstreifen in der Gefäßwand.

Endprodukt aller beschriebenen Theorien ist eine Immunreaktion in der Gefäßwand, die unter Beteiligung vieler Mediatoren, Moleküle und Zellen stattfindet. Im Rahmen dieser kommt es zur Produktion von Adhäsionsmolekülen, Einwanderung von Lymphozyten und Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. All diese Vorgänge bedingen schließlich die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und Sekretion von extrazellulärer Matrix und führen am Ende zur Bildung so genannter fibröser Plaques. Dies sind Zellagglomerate, die aus einem Kern, der Lipid und nekrotisches Material enthält und einer darum angelagerten aus Bindegewebe und glatten Muskelzellen bestehenden fibrösen Kappe aufgebaut sind. Außerdem finden sich zahlreiche Makrophagen und aktivierte T-Lymphozyten. Den nekrotischen Kern bedingen zugrunde gegangene Schaumzellen (Berliner u. Heinecke 1996, Ross 1995). Diese Plaques engen das Gefäßlumen ein und erniedrigen dadurch den arteriellen Blutfluss, wodurch es zu einer verminderten Perfusion und Sauerstoffversorgung des umliegenden

Gewebes kommt. Zusätzlich kann es bei Verkalkung, Erosion oder Ruptur der Plaques und Freisetzung von Tissue Factor zur Thrombozytenaggregation kommen. Die so entstehenden Thromben können in kürzester Zeit zum vollständigen Gefäßverschluss führen oder auch Thrombembolien hervorrufen (Falk 2006, Ross 1999). Klinisches Erscheinungsbild der beschriebenen Vorgänge sind Herzinfarkt, Schlaganfall oder pAVK.

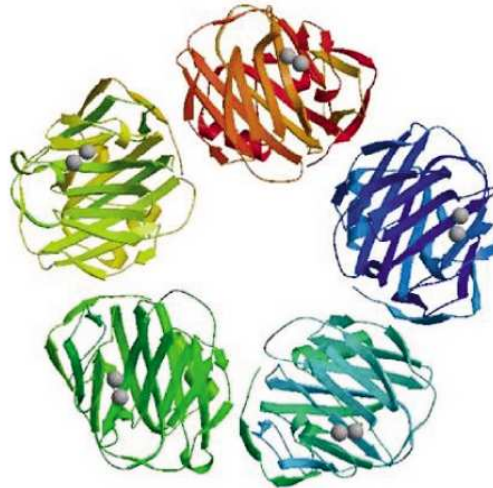
Da die Atherosklerose ein sehr komplexer Vorgang ist, konnten Ätiologie und Pathogenese nicht bis ins letzte Detail entschlüsselt werden. Zahlreiche bisher nicht genannte Theorien weisen auf die Rolle der verschiedensten Stoffe hin. So gibt es Publikationen, die auf eine Beteiligung von Immunglobulinen (Ig) und Komplementsystem aufmerksam machen (Anderson et al. 2007, Oksjoki et al. 2007, Vlaicu et al. 1985, Torzewski et al. 1996). Auch der Einfluss bestimmter Bakterien, zum Beispiel *Chlamydia pneumoniae* und Viren wie das Zytomegalievirus können im Moment nicht ausgeschlossen werden (Saikku 1993, Lunardi et al. 2007). Zudem wird die Rolle des C-reaktiven Proteins (CRP) diskutiert. Dieser Zusammenhang soll im Folgenden dargestellt werden.

### **1.2 C-reaktives Protein**

#### **1.2.1 Geschichte, Molekülstruktur, Funktion**

Das C-reaktive Protein wurde erstmals 1930 von Tillet und Francis beschrieben. Es erhielt seinen Namen durch seine Fähigkeit mit dem C-Polysaccharid von Pneumokokken eine Bindung einzugehen (Tillet u. Francis 1930). Es besteht aus fünf identischen nicht glykosilierten Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 21 kiloDalton (kD), die nicht kovalent gebunden in kreisförmiger Symmetrie angeordnet sind (Abbildung [Abb.] 1). Aufgrund dieser Struktur gehört CRP zur Familie der Pentraxine.

Es ist ein Akute-Phase-Protein und steigt bei Infektionen, Gewebeverletzungen und malignen Tumorerkrankungen rasch an. Daher ist es ein Laborparameter mit hoher klinischer Relevanz und findet beim Screening und Therapiemonitoring entzündlicher Prozesse Anwendung (Pepys u. Hirschfield 2003).



**Abb. 1: Molekulare Struktur des C-reaktiven Proteins (Pepys u. Hirschfield 2003)**

Die biologische Funktion von CRP besteht in der Wirkung als Immunmodulator durch Bindung biologischer Partikel und bestimmter Liganden. Hierdurch können Abfallprodukte und körperfremde Stoffe opsonisiert werden. Durch Bindung von Bakterien oder apoptotischen Zellen an CRP, werden diese Komplexe von Makrophagen erkannt und abgeräumt. Auch das Komplementsystem und andere Signalkaskaden können über Bildung dieser „CRP-Komplexe“ aktiviert werden (Black et al. 2004).

### **1.2.2 CRP und Atherosklerose**

Da es sich bei der Atherosklerose um einen inflammatorischen Prozess handelt, wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhten CRP-Spiegeln im Plasma und einem größeren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen vermutet. Bisher konnte in vielen Studien eine Korrelation gezeigt werden (König et al. 1999, Kuller et al. 1996, Blake u. Ridker 2002, Berk et al. 1990, Ridker et al. 2000). CRP gilt daher als prädiktiver Risikomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen und ist in dieser Beziehung sogar dem LDL überlegen (Ridker et al. 2002). Die Bestimmung des CRP-Plasmaspiegels wurde deshalb in die Leitlinien der American Heart Association zur Risikostratifizierung kardiovaskulärer Erkrankungen aufgenommen (Pearson et al. 2003). Auch konnte in Studien gezeigt werden, dass

CRP zur Bewertung der Mortalität bestimmter Patienten (Kompoti et al. 2008, Morrow et al. 1998) und zu deren klinischem „Outcome“ herangezogen werden kann (Ridker et al. 2005, Liuzzo et al. 1994). Allerdings gab es auch wieder Untersuchungen, die den ursächlichen Zusammenhang zwischen CRP und Atherosklerose kritisch beurteilten (Lloyd-Jones et al. 2006) und keine oder nur moderate Effekte von CRP bei der Atherogenese feststellen konnten (Danesh et al. 2004, Torzewski M et al. 2008). Daher ist bis dato umstritten, ob es sich bei erhöhten CRP-Spiegeln nur um ein Produkt der Atherogenese handelt, oder das Protein aktiv zur Pathogenese beiträgt und somit einen Risikofaktor darstellt.

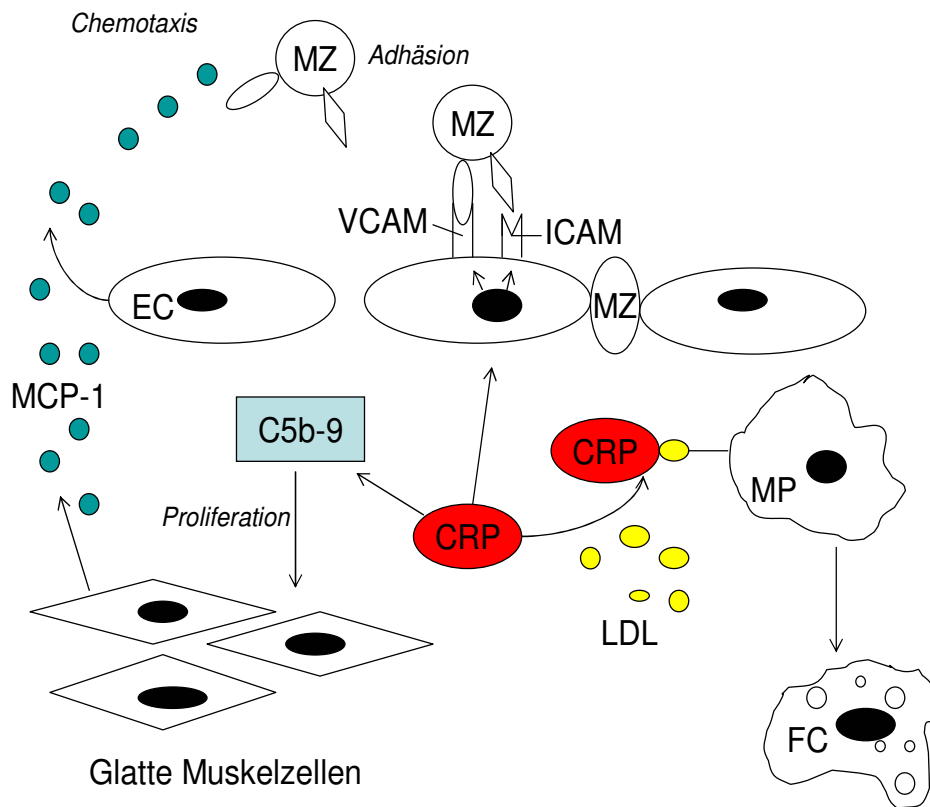
Seit dem sicheren Nachweis von CRP in atheromatösen Plaques (Reynolds u. Vance 1987, Torzewski et al. 1998) ist es nahe liegend, dass CRP ursächlich am pathologischen Prozess teilnimmt und die ablaufenden Vorgänge beeinflusst.

Hinweise, die für eine Beteiligung von CRP an der Atherogenese (Abb. 2) sprechen gab es bereits 1982, als eine Interaktion mit LDL gezeigt werden konnte (de Beer et al. 1982). CRP kann unter Anwesenheit von Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) Apolipoprotein-B enthaltende Phospholipide binden und fördert so deren Aufnahme in Makrophagen (Zwaka et al. 2001). Als Bindungsstelle wurden die IgG-Rezeptoren  $\text{FC}\gamma\text{RIIa}$  und  $\text{FC}\gamma\text{RI}$  auf Makrophagen und Monozyten identifiziert (Bharadwaj et al. 1999, Tron et al. 2008). Nach Bindung der CRP-Ligand-Komplexe an ihrer Oberfläche werden Makrophagen zur Phagozytose angeregt. CRP scheint somit maßgeblich an der Schaumzellbindung beteiligt zu sein.

Zusätzlich begünstigen gebildete CRP-Komplexe Monozyten zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und tissue factor (Cermak et al. 1993, Ballou u. Lozanski 1992), außerdem zur Adhäsion am Gefäßendothel und Chemotaxis in die arterielle Gefäßwand. Dies geschieht zum einen durch eine direkte Aktivierung der Monozyten, zum anderen indirekt über die Stimulation von Endothelzellen, die Zelladhäsionsmoleküle wie Intercellular Adhesion Molecules (ICAM), Vascular Adhesion Molecules (VCAM), E-selectin, Zytokine und Mediatoren, wie z.B. Monozyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) sezernieren (Pascariet al. 2000, Jialal et al. 2004). Letzteres gehört zu den wichtigsten chemotaktisch wirksamen Molekülen (Torzewski et al. 1996). Möglicherweise werden auch glatte Muskelzellen über CRP-abhängige Signalkaskaden aktiviert (Hattori et al. 2000,

Jialal et al. 2004). CRP trägt daher nicht nur zur Schaumzellbildung bei, sondern verstärkt durch seine Interaktionen mit den verschiedenen Zellen auch die ablaufenden Entzündungsvorgänge in der Gefäßwand. All diese Effekte sprechen für eine aktive Beteiligung von CRP insbesondere an der frühen Phase der Atheroskleroseentstehung.

Des Weiteren vermag CRP das Komplementsystem über den klassischen Weg zu aktivieren (Wolbink et al. 1996, Volanakis 1982). Das Komplementsystem ist Bestandteil der humoralen Immunantwort und führt über eine Signalkaskade unter Entstehung verschiedener Spaltprodukte zum Entstehen der Komplementkomponenten C5b-C9 (C5b-9). Diese bilden den Membran Angriffs Komplex (MAC), der auch als terminaler Komplementkomplex bezeichnet wird und die Aufgabe hat Bakterien und andere Fremdkörper zu lysieren. Dem Komplementsystem wird auch eine bedeutsame Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose zugeschrieben (Anderson et al. 2007, Oksjoki et al. 2007, Vlaicu et al. 1985, Torzewski et al. 1996). Gestützt wird diese These durch den Nachweis von Anteilen der Komplementkaskade in atherosklerotischen Plaques (Niculescu et al. 1987) und Studien, in denen Komplementfaktor 6 defiziente Tiere nach Cholesterinfütterung eine reduzierte Plaqueentwicklung aufwiesen (Geertinger u. Soerensen 1977, Schmiedt et al. 1998). Durch den immunhistochemischen Nachweis des terminalen Komplementkomplexes in frühen atherosklerotischen Läsionen kann von einer Beteiligung des Komplementsystems insbesondere im Anfangsstadium der Atherogenese ausgegangen werden (Torzewski et al. 1998). C5b-9 regt glatte Muskelzellen zur Proliferation an (Niculescu et al. 1999) und induziert in ihnen außerdem die Expression von MCP-1, das wie bereits oben erwähnt zur Rekrutierung und Einwanderung von Monozyten führt (Torzewski et al. 1996). Die Kolokalisation von C5b-9 mit CRP in der Intima von atherosklerotisch veränderten Gefäßen kann als CRP-vermittelte Komplementaktivierung in der arteriellen Gefäßwand betrachtet werden (Torzewski et al. 1998).



**Abb. 2:** Darstellung der Beteiligung des C-reaktiven Proteins (CRP) an der Pathogenese der Atherosklerose: CRP bindet an low density lipoprotein (LDL) und präsentiert dieses Makrophagen (MP), was zur Bildung von Schaumzellen (FC) beiträgt. Es stimuliert Endothelzellen (EC) zur Expression der Adhäsionsmoleküle Vascular Adhesion Molecules (VCAM) und Intercellular Adhesion Molecule (ICAM) und des Mediators Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), wodurch es zur Chemotaxis und Adhäsion von Monozyten (MZ) aus der Blutbahn am Gefäßendothel kommt. Außerdem führt eine Aktivierung des Komplementsystems über die Komplementkomponenten C5b-C9 (C5b-9) zur Proliferation glatter Muskelzellen und Ausschüttung von MCP-1.

### **1.3 Reduktion der proatherogenen Effekte von CRP**

Da es wie oben beschrieben zahlreiche Hinweise darauf gibt, dass CRP ursächlich an der Atherogenese beteiligt ist, könnte die Blockade der durch CRP vermittelten Effekte zum Ziel der kardiovaskulären Therapie genutzt werden. Hierbei gibt es theoretisch verschiedene Möglichkeiten:

- Hemmung der CRP-vermittelten Komplementaktivierung
- Blockade des CRP-Rezeptors
- Transkriptionelle Hemmung der CRP-Synthese

Die letzte der aufgeführten Möglichkeiten scheint die Aussichtreichste zu sein, da hierbei alle proatherogenen Effekte von CRP supprimiert werden könnten. Diesem Punkt soll auch in der folgenden Arbeit die größte Bedeutung zukommen.

### **1.4 CRP-Synthese**

CRP wird vorwiegend in Zellen der Leber synthetisiert (Pepys u. Hirschfield 2003). Allerdings zeigen neuere Publikationen, dass das Molekül auch lokal in glatten Muskelzellen der Gefäßwand und in atherosklerotischen Läsionen produziert wird. Hierbei kann es direkt an den in der Gefäßwand ablaufenden inflammatorischen Prozessen teilnehmen (Yasojima et al. 2001, Calabro et al. 2003). Da primäre humane Hepatozyten für in vitro Versuche aus ethischen und technischen Gründen nur eingeschränkt verfügbar sind, konnte der genaue molekulare Mechanismus der CRP-Synthese bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden (Gomez-Lechon et al. 2003). Von Untersuchungen mit Hepatomzelllinien weiß man, dass die Synthese hauptsächlich durch Zytokine stimuliert wird. Hierbei ist der stimulierende Effekt von Interleukin (IL)-6 und IL-1 $\beta$  schon längere Zeit bekannt (Moshage et al. 1988, Black et al. 2004, Pepys u. Hirschfield 2003, Jialal et al. 2004), wohingegen die Erkenntnis, dass auch IL-17 einen aktivierenden Effekt besitzt, relativ neu ist (Patel et al. 2007). IL-6 und IL-1 $\beta$  wirken synergistisch an den ersten 157 Basenpaaren (bp) des CRP-Promoters, wobei für IL-1 $\beta$  alleine in Zellen der Hepatomzelllinie 3B keine Wirkung gezeigt werden konnte (Zhang et al. 1995). Diskutiert wurde in diesem Zusammenhang, dass IL-1 $\beta$  seine Wirkung über Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) vermittelt (Voleti u. Agrawal 2005). Neueste



Untersuchungen gehen davon aus, dass IL-1 $\beta$  über einen autokrinen IL-6-Loop, der von den Transkriptionsfaktoren CCAAT-box/Enhancer Binding Protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) und NF- $\kappa$ B abhängt, zur Induktion von IL-6 führt (Kramer et al. 2008). Weitere Experimente beschreiben eine transkriptionelle Komplexbildung der Faktoren c-Fos, Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) und Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\alpha$  (HNF-1 $\alpha$ ), die für die synergistische CRP-Expression durch IL-1 und IL-6 essentiell ist (Nishikawa et al. 2008).

Die IL-6-vermittelte CRP-Expression (Abb. 3) erfolgt einerseits über die Janus Kinase (JAK)/STAT-Signalkaskade mit dem Transkriptionsfaktor STAT3, andererseits über den Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)-Signalweg mit Aktivierung des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  (Voleti u. Agrawal 2005, Heinrich et al. 2003). Durch Bindung von IL-6 an einen Rezeptorkomplex, bestehend aus dem IL-6-Rezeptor und zwei Glycoprotein (gp) 130 Molekülen, kommt es zu mehreren Phosphorylierungsvorgängen, die eine Bindung verschiedener Signalmoleküle, unter anderem auch dem Transkriptionsfaktor STAT3 am gp130 bedingen und die außerdem zu einer Aktivierung von JAK führen. Beim JAK/STAT-Signalweg kommt es nun zu einer Aktivierung der gebundenen STAT3-Moleküle, die anschließend dimerisieren und nach Translokation in den Zellkern an ihre Bindungsstelle bei -108 bp an den CRP-Promoter binden, wo sie eine Transkription herbeiführen (Zhang et al. 1996).

Bei der MAPK-Signalkaskade werden verschiedene Signalmoleküle durch Phosphorylierung von JAK aktiviert, was letztendlich über eine Ras/Raf/Mitogen-dependent Erk Kinase(MEK)/MAPK-Signaltransduktion zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  führt (Heinrich et al. 2003, Alonzi et al. 2001, Williams et al. 1995). Dieser wird unter anderem auch als Nuclear Factor IL-6 $\alpha$  (NFIL-6 $\alpha$ ) bezeichnet und ist nicht zuletzt wegen seiner Beteiligung an der Induktion von IL-6 bedeutsam (Matsusaka et al. 1993, Ramji et al. 1993). Bei Bindung von C/EBP $\beta$  an den CRP-Promoter löst dieser ebenfalls eine Transkription aus, wobei zwei responsive elements für C/EBP $\beta$  auf dem CRP-Promoter bei -51 bis -54 bp und bei -215 bis -217 bp bekannt sind, die synergistisch wirken und somit nur bei gleichzeitiger Besetzung zu einer vollständigen IL-6-induzierten Aktivität führen können (Li u. Goldman 1996).

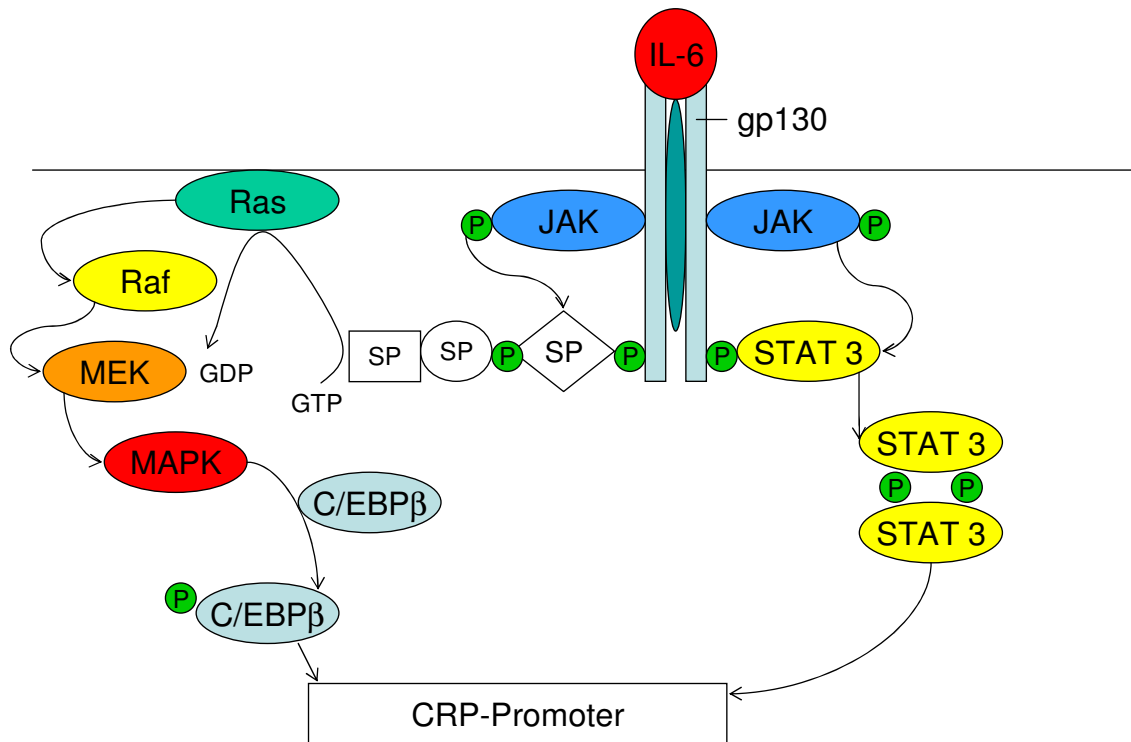
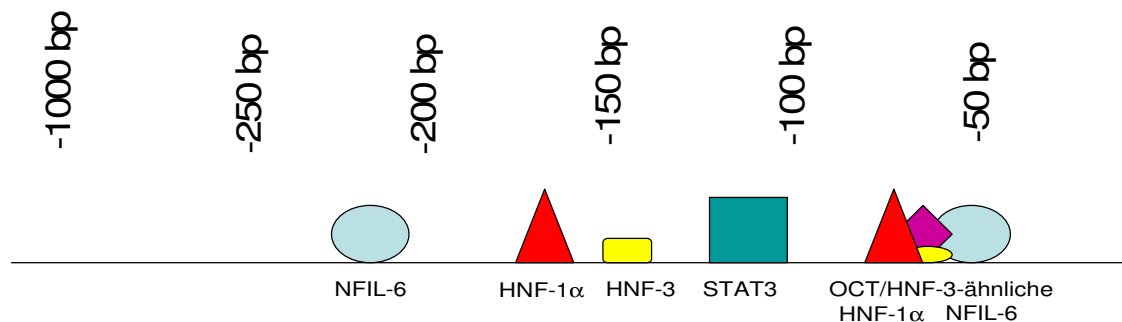


Abb. 3: Überblick über die Interleukin (IL)-6-vermittelte Signaltransduktion, die durch Bindung von IL-6 am IL-6-Rezeptorkomplex, bestehend aus dem eigentlichen IL-6-Rezeptor und zwei Glykoprotein (gp) 130 Molekülen ausgelöst wird. Diese verläuft zum einen über den Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT)-Signalweg, bei dem JAK durch Phosphorylierungsvorgänge (P) eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 hervorruft, der nach Dimerisierung an den Promoter des C-reaktiven Proteins (CRP) bindet. Zum anderen aktiviert JAK ebenfalls durch Phosphorylierung verschiedene Signalproteine (SP), woraufhin es unter Spaltung von Guanosintriphosphat (GTP) in Guanosindiphosphat (GDP) durch die GTPase Ras zu einer Kettenreaktion der Kinasen Raf, Mitogen-dependent Erk Kinase (MEK), Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) kommt, welche schließlich in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  mündet. Dieser bindet ebenfalls an den CRP-Promoter und führt dort eine Transkription herbei. (Heinrich et al. 2003)

## 1. Einleitung

---

Neben C/EBP $\beta$  und STAT3 gibt es noch eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren (Abb. 4), die die CRP-Synthese modifizieren. So sind HNF-1 $\alpha$ , HNF-3 und Octamer (OCT)-ähnliche Transkriptionsfaktoren für die grundlegende Regulation der CRP-Expression verantwortlich. Auf dem CRP-Promoter existiert eine die CRP-Expression positiv regulierende Bindungsstelle für HNF-1 $\alpha$  bei -69 bis -70 bp und eine negativ regulierende für OCT/HNF-3-ähnliche Faktoren bei -59 bis -60 bp (Li u. Goldman 1996, Toniatti et al. 1990, Voleti u. Agrawal 2005). Abb. 4 gibt einen Überblick über die Bindungsstellen der an der CRP-Synthese beteiligten Transkriptionsfaktoren auf dem CRP-Promoter. Insgesamt wird ersichtlich, dass sowohl stimulierende als auch inhibierende Transkriptionsfaktoren an den CRP-Promoter binden und so die CRP-Expression steuern können.



**Abb. 4: Überblick über die Lage der einzelnen Transkriptionsfaktoren Nuclear Factor IL-6 $\alpha$  (NFIL-6 $\alpha$ ), Hepatocyte Nuclear Factor (HNF)-1 $\alpha$  und -3, sowie Octamer (OCT)-ähnliche auf dem Promoter des C-reaktiven Proteins (Li u. Goldman 1996)**

Auch NF- $\kappa$ B scheint insbesondere mit seinen Untereinheiten c-Rel, p50 und p65 Einfluss auf die CRP-Synthese zu nehmen. Für die Untereinheiten p50 und p65 konnte eine synergistische Wirkung mit C/EBP $\beta$  und STAT3 gezeigt werden (Agrawal et al. 2001, Agrawal et al. 2003 a). Für die Untereinheit c-Rel ist bekannt, dass sie an C/EBP $\beta$  bindet und die CRP-Expression steuern soll, indem sie die Bindung dieses Transkriptionsfaktors an den CRP-Promoter erleichtert (Agrawal et al. 2003 b). Da NF- $\kappa$ B typischerweise durch IL-1 $\beta$  aktiviert wird, wird in verschiedenen Publikationen, wie bereits oben erwähnt, ursächlich davon ausgegangen, dass die synergistische Wirkung, die IL-1 $\beta$  auf die IL-6-induzierte CRP-Synthese hat, durch NF- $\kappa$ B vermittelt wird (Voleti u. Agrawal 2005). Allerdings konnte bisher noch keine allgemein anerkannte Gensequenz für nF- $\kappa$ B auf dem proximalen CRP-Promoter identifiziert werden (Nishikawa et al. 2008). Nicht unerwähnt soll an dieser Stelle außerdem eine Beteiligung der Proteinkinase C an der CRP-Expression bleiben (Ivashchenko et al. 2005). Zusammenfassend lässt sich schließlich sagen, dass es sich bei der CRP-Synthese um ein kompliziertes Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren handelt, die die Expression des Akute-Phase-Proteins sowohl stimulierend als auch inhibierend modifizieren.

### 1.5 Galiellalacton

Mittelpunkt der Arbeit ist eine Substanz mit dem Namen Galiellalacton (Abb. 5), die im Hinblick auf ihre Eigenschaften bezüglich einer Hemmung der CRP-Synthese getestet wurde und diskutiert werden soll.

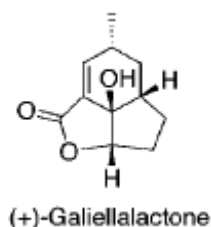


Abb. 5: Molekularstruktur von Galiellalacton (Johansson u. Sterner 2001)

Galiellalacton ist ein Pilzmetabolit, der erstmals 1989 während der Suche nach neuen Wachstumsregulatoren aus Pilzen entdeckt wurde. Das Tetrahydroisobenzofuranonederivat kann aus dem Ascomyceten A111-95 durch Fermentation und aus *Galiella rufa*, einem anderen Galiellalacton-produzierenden Stamm, isoliert werden (Weidler 2000, Köpcke et al. 2002). Die Struktur wurde bereits 1989 aufgeklärt, eine erste detaillierte Beschreibung liefert aber erstmals Weidler (Weidler 2000). Mittlerweile ist es auch gelungen die Substanz synthetisch herzustellen (Johansson u. Sterner 2001). Galiellelacton ist ein hoch selektiver Inhibitor IL-6-abhängiger Signalkaskaden in Zellen der Hepatomzelllinie G2 (HepG2-Zellen). Ursache dieser Hemmung ist die Unterbrechung des IL-6-vermittelten JAK/STAT-Signalwegs. Röntgenstrukturanalysen haben gezeigt, dass Galiellalacton eine irreversible Bindung mit dem Cystinrest der DNA-Bindungsstelle aktivierter STAT3 Moleküle eingeht (Hellsten et al. 2008). Dadurch kann keine Interaktion mehr mit den responsive elements der Zielgene erfolgen. Die IL-6-vermittelte Transkription bleibt somit aus.

Auch für die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, Activator Protein-1 (AP-1) und Nuclear Factor of activated T-cells (NF-AT) konnte eine Hemmung durch Galiellalacton gezeigt werden, wobei in diesbezüglichen Versuchen hierzu deutlich höhere Konzentrationen von Nöten waren (Weidler et al. 2000).

### **1.6 Fragestellung**

Zahlreiche Untersuchungen beschreiben bisher eine ursächliche Beteiligung des CRPs an der Atherogenese. Die Hemmung der CRP-Synthese scheint daher ein aussichtsreicher Ansatzpunkt in der kardiovaskulären Therapie zu sein. Mit Galiellalacton wurde eine Substanz entdeckt, die IL-6-abhängige Signalkaskaden hemmen kann. Da IL-6 der Hauptstimulator der CRP-Synthese ist, scheint eine genauere Erforschung der Wirkung der Substanz auf die CRP-Synthese viel versprechend. Diese Wirkung soll in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Kaninchenhepatozyten getestet werden. Des Weiteren sollen Eigenschaften und Wirkmechanismen von Galiellalacton mit Hilfe von transfizierten Hep-G2-Zellen untersucht werden. Folgende Fragen stehen hierbei im Vordergrund:

## 1. Einleitung

---

Kann CRP in Überständen von mit IL-6 stimulierten Kaninchenhepatozyten qualitativ nachgewiesen und durch Galiellalacton quantitativ reduziert werden?

Verursacht Galiellalacton eine Freisetzungs- oder eine Synthesehemmung von CRP?

Welcher Teil des CRP-Promoters ist, sollte es sich um eine Galiellalacton-vermittelte CRP-Synthesehemmung handeln, an dieser beteiligt? Wie ist der genaue Wirkmechanismus von Galiellalacton am CRP-Promoter?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Biologische Materialien

Kaninchen vom Typ New Zealand White Rabbit zur Isolation von primären Kaninchenhepatozyten (PKH)

Mit dem „full length“ (fl), d.h. dem vollständigen 1000 bp umfassenden CRP-Promoter bzw. Abschnitten von 100, 150 und 250 bp des CRP-Promoters und dem Gen der Luciferase stabil transfizierte HepG2-Zellen: Die Klone wurden abhängig von der Länge der transfizierten CRP-Promotersequenz folgendermaßen benannt:

- HepG2-fl-p1000CRP/luciferase
- HepG2-p100CRP/luciferase
- HepG2-p150CRP/luciferase
- HepG2-p250CRP/luciferase

#### 2.1.2 Testsubstanz

Galiellalacton

Sanofi-Aventis, Frankfurt

#### 2.1.3 Reagenzien

$\beta$ -Mercaptoethanol

Sigma, Deisenhofen

Ampuwa (destilliertes Wasser)

Fresenius, Bad Homburg

Bromphenolblau (BPB)

Sigma, Deisenhofen

CRP Referenzserum human 1,0 mg/ml

Calbiochem, USA

CRP Referenzserum rabbit

Calbiochem, USA

Dexamethason

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Sigma, Deisenhofen

Digest Medium

Invitrogen, Karlsruhe

## 2. Material und Methoden

---

Eisessig	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Glycin	Fluka, Seelze
HCL	Merck, Darmstadt
Hepatocyte Wash Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Invitrogen, Karlsruhe
Interleukin-6	tebu-bio, Offenbach
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)	Invitrogen, Karlsruhe
Kollagenlösung Typ I	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Liver Perfusion Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Fluka, Seelze
Page-Ruler (Marker für Western Blot)	Fermentas, St. Leon-Rot
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin-Streptomycin (PSG)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin 1U/μg	Invitrogen, Karlsruhe
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Serva, Heidelberg
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Trizma Base	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Österreich
Williams E Medium	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.4 Antikörper

Chicken-Anti-Rabbit-CRP	DUNN Labortechnik, Asbach
Ziege-Anti-Chicken-HRP	DUNN Labortechnik, Asbach



### 2.1.5 KITS

BCA Protein Assay	Pierce, Rockford, USA
Bright-Glo Luciferase Assay System	Promega GmbH, Mannheim
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability	Promega GmbH, Mannheim
ECL Reagenz	Amersham Biosciences, Braunschweig
Rabbit High-Sensitive CRP ELISA	Kamiya Biomedical Company, Seattle, USA

### 2.1.6 Sonstige Gebrauchsmaterialien

3MM-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
24-Wellplatte	Becton Dickenson, Heidelberg
96-Wellplatte	Becton Dickenson, Heidelberg
Fertiggel: Pro Gel Tris-Glycin Gel 4-20%	Anamed Elektrophorese GmbH, Darmstadt
Film - Cronex 5	Agfa, Mortsel, Belgien
Filter 100 µm, 70 µm	Becton Dickenson, Heidelberg
Laborglasflaschen Schott Duran 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml	Schott, Mainz
Kanüle Sterican Gr. 12	B. Braun, Melsungen
Konisches Röhrchen 25 ml, 50 ml	Becton Dickenson, Heidelberg
Küvetten	Ratiolab, Dreieich
Luminometer Tube	Sarstedt, Nümbrecht
Multipipettenspitzen 5 ml, 10 ml, 25 ml	Eppendorf, Hamburg
Mundschutz, Haube, Überschuhe	Hartmann, Heidenheim
Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
OP-Kit	Cardinal Health, Dublin, USA
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl, 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Sterile Einmalpipetten 10 ml, 25 ml, 50 ml	Becton Dickenson, Heidelberg

## 2. Material und Methoden

---

Sterile Einmalspritzen 2 ml, 15 ml, 20 ml	Becton Dickenson, Heidelberg
Sterile Glasschale	VWR, Ulm
Sterile Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Steriler Kittel	Cardinal Health, Dublin, USA
Sterile Kompresse	Hartmann, Heidenheim
Steriles OP-Besteck: OP-Klemme, Scharfer Löffel, Pinzette	Aesculap, Tuttlingen
Steriles Skalpell	Aesculap, Tuttlingen
Sterile Tücher	Hartmann, Heidenheim
Sterilium	B. Braun, Melsungen
T75-Zellkulturflasche	Becton Dickenson, Heidelberg
Vasofix Braunüle 14G	B. Braun, Melsungen
Vicryl Faden 2/0	Ethicon, Norderstedt

### 2.1.7 Geräte

12-Kanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Vakuumpumpe – Laboport	KNF Neuberger, Freiburg
Blottinggerät – Trans-Blot Semi-Dry	Bio-Rad, München
CO <sub>2</sub> -Inkubator – Hera cell	Heraeus, Hanau
Einmalzählkammer	Peqlab, Erlangen
ELISA-Reader	MWG-Biotech, Ebersberg
Optimax x-ray film processor	Protec Medizintechnik, Oberstenfeld
Filmkassette – Hyperkassette	GE Health Care, München

## 2. Material und Methoden

---

Glaspipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml	VWR, Darmstadt
Kühlschrank – Liebherr economy	Liebherr, Rostock
Laminar Air Flow Bench	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop	Nikon TMS, Düsseldorf
Luminometer (Reagenzgläser) – flash'n glow	Berthold Technologies, Bad Wildbach
Luminometer (Lochplatten) – Centro LB 960	Berthold Technologies, Bad Wildbach
Magnetrührer – RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt
Pipettboy	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipette 2, 20, 100, 200, 1000 µl, 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Photometer – SmartSpec 3000	Bio-Rad, München
Schüttelinkubator – Variomag monoshake	H+P Labortechnik, Oberschleissheim
Stromgerät – Power Pac 300	Bio-Rad, München
Thermomixer – Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Waage – Adventurer™	Ohaus, Shanghai, China

## 2. Material und Methoden

---

Western-Blot-Kammer – Hoefer mini VE	Hoefer, San Francisco, USA
Wippe – Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Zellcounter – Easy TTC	Schärfe System, Reutlingen
Zentrifuge (groß) – Varifuge 3.0R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge (klein) – Biofuge pico	Heraeus, Hanau

### 2.1.8 Medien zur Zellkultur

HepG2-Medium:	88%	IMDM
	10%	FCS
	1%	L-Glutamin
	1%	PSG
Hepatozytenanwachsmedium:	455 ml	Williams E
	5 ml	L-Glutamin
	10 ml	Pen/Strep 1 U/ $\mu$ g
	50 $\mu$ l	Dexamethason
	5 ml	ITS
	25 ml	FCS
Hepatozytenkultiviermedium:	480 ml	Williams E
	5 ml	L-Glutamin
	10 ml	Pen/Strep 1 U/ $\mu$ g
	50 $\mu$ l	Dexamethason
	5 ml	ITS

### 2.1.9 Puffer und Lösungsmittel

10-fach Laufpuffer:	60,2 g	Tris
	112,6 g	Glycin
	100 ml	10% SDS
	1 l	Ampuwa
Probenpuffer 5-fach Lämmli:	8,4 ml	2 M Tris HCL pH 6,8
	25 g	0,1% BPB
	8,3 g	Glycin
	3,3 g	SDS
	25 ml	Ampuwa
Transferpuffer:	1,5 g	Trizma Base
	7,5 g	Glycin
	5 ml	10% SDS
	100 ml	Methanol
	500 ml	Ampuwa
TBS/Tween 20:	1 ml	Tween 20
	1 l	TBS
Essigsäure 0,02 molar:	600 µl	Eisessig
	500 ml	Ampuwa

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zellkultivierung

##### 2.2.1.1 Isolation und Kultivierung primärer Kaninchenhepatozyten

Vor der Isolation erfolgte die Beschichtung von T75-Zellkulturflaschen und 24- bzw. 96-Wellplatten mit Kollagen Typ I, um eine Adhärenz der Hepatozyten zu gewährleisten. Für einen Versuch wurden vier 24-Wellplatten und zwei 96-Wellplatten benötigt, wobei die 24-Wellplatten nach erfolgter Stimulation (s. 2.2.2) anschließend zur quantitativen CRP-Bestimmung im CRP-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (s. 2.2.4) und die 96-Wellplatten zu Vitalitätstests (s. 2.2.6) herangezogen wurden. Für die qualitative CRP-Bestimmung im Western Blot (s. 2.2.3) wurden 4 T75-Flaschen benötigt. Zum Beschichten wurde Kollagen Typ I mit 0,02 molarer Essigsäure verdünnt, wobei die Verdünnung so berechnet wurde, dass insgesamt 2 µg Kollagen pro cm<sup>2</sup> verwendet wurden. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 37° C wurde der Überstand entfernt und die Gefäße dreimal mit PBS gewaschen. Gleich anschließend erfolgte die Zugabe der Zellsuspension nach dem in Tabelle (Tab.) 1 abgebildeten Schema.

**Tab. 1: Schema zur Aussaat von primären Kaninchenhepatozyten und von mit dem full length (fl) bzw. Abschnitten des Promoters des C-reaktiven Proteins (CRP) und dem Luciferasegen stabil transfizierten Zellen der Hepatomzelllinie G2 (HepG2-Zellen): HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase**

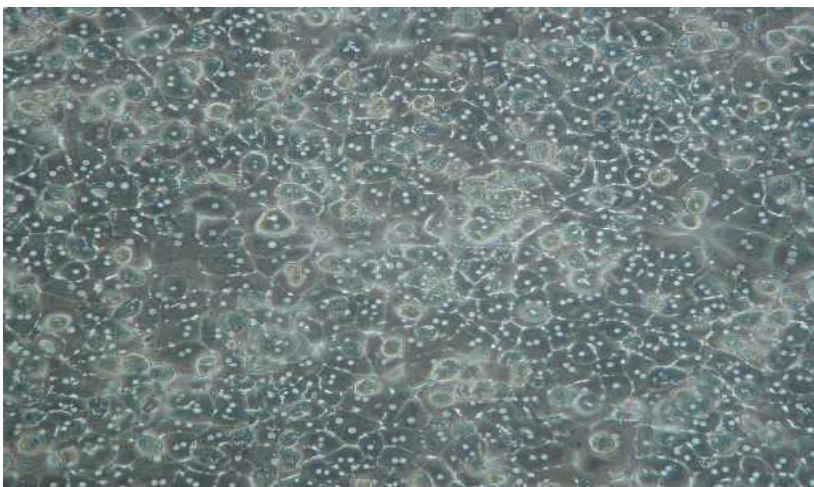
Kulturschale/-flasche	cm <sup>2</sup>	ml Medium	Zellaussaat 50000/cm <sup>2</sup>
T75	75 cm <sup>2</sup>	10 ml	3,75 x 10 <sup>6</sup>
24-Loch	2 cm <sup>2</sup>	1 ml	10 <sup>5</sup> /Loch
96-Loch	0,34 cm <sup>2</sup>	100 µl	17 000/Loch

## 2. Material und Methoden

---

Isoliert wurden Leberzellen aus Kaninchen vom Typ New Zealand White Rabbit unter sterilen Bedingungen. Die Genehmigung der zuständigen Behörde lag bei Versuchsbeginn vor.

Zuerst wurde der Bauchraum des zuvor getöteten Kaninchens bis zum Sternum eröffnet, um Vena porta, Vena cava superior und Vena cava inferior aufzusuchen und freizupräparieren. Danach wurde die Vena cava inferior nahe der renalen Gefäße abgebunden und eine Braunüle eingelegt, da die Leber im Zuge der Hepatozytenisolation mit verschiedenen Medien perfundiert werden musste. Die Vena cava superior wurde mit Hilfe einer OP-Klemme abgeklemmt und die Vena porta eingeritzt. Anschließend wurde eine Infusion mit 350 ml Liver Perfusion Medium zur Spülung der Kaninchenleber für 8 min und 45 s angehängt um diese zu „entbluten“. Gleich darauf wurde mit 850 ml kollagenasehaltigem Liver Digest Medium für 11 min perfundiert, um die Hepatozyten aus dem umliegenden Gewebe herauszulösen. Nach diesem Schritt sollte die Leber ein karamellähnliches Aussehen haben. Die Braunüle wurde nun entfernt und die Leber nach Freipräparation aus dem Bauchraum und Entfernung der Gallenblase in eine mit 250 ml Digestmedium vorbereitete Glasschale gelegt. Hier wurde die Kapsel mit einem Skalpell eingeschnitten und die Hepatozyten mit einem scharfen Löffel herausgekämmt. Die erhaltene Zellsuspension wurde über 100 µm Filter auf acht Falcons verteilt. Diese wurden anschließend mit zuvor auf Eis gelagertem Hepatocyte Wash Medium auf 50 ml aufgefüllt.



**Abb. 6: Primäre Kaninchenhepatozyten am Tag 3 nach Isolation**

Im Zellkulturlabor wurden die Zellen nun unter der Laminar Air Flow Bench steril durch einen 70 µm Filter filtriert. Anschließend wurde zwei Minuten bei 500 Umdrehungen (U)/min und 10° C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte eine Resuspension des Pellets in 50 ml kaltem Hepatocyte Wash Medium. Dieser Schritt wurde mit allen 10 Falcons vier Mal wiederholt. Danach wurden die Zellen unter weiteren Waschvorgängen in einem Falcon zusammengeführt. Der Waschvorgang wurde so lange fortgesetzt bis der Überstand klar war. Nach Beendigung wurde das Waschmedium abgesaugt und es erfolgte eine erneute Resuspension des Pellets diesmal in Hepatozytenanwachsmedium. Nach Zählen der Zellen mit Hilfe eines Zellcounters, der die Zellzahl über Widerstandmessung bestimmte, konnten diese nun in die mit Kollagen beschichteten Wellplatten und Flaschen mit der entsprechenden Zelldichte (Tab. 1) ausgesät werden. Die Zellen wurden bei 37° C unter 5% Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) inkubiert, bis sie adherierten. Nach zwei Stunden erfolgte ein Wechsel des Anwachsmediums, nach 24 h wurde das Anwachsmedium durch Hepatozytenkultiviermedium ausgetauscht. Abb. 6 zeigt PKH am Tag 3 nach Isolation.

### **2.2.1.2 Aufbau und Namensgebung von HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase**

Den Ausgangspunkt für die verschiedenen verwendeten Zellkonstrukte stellen die aus dem Tumorgewebe eines 15-jährigen argentinischen Jungen mit hepatozellulärem Karzinom stammenden so genannten HepG2-Zellen dar. Sie sind in der Lage zahlreiche Proteine, darunter auch das CRP zu produzieren. Gearbeitet wurde mit transfizierten HepG2-Zellen, die bereits vor Versuchsbeginn mit einem CRP-Promoter-Luciferase-Konstrukt stabil transfiziert waren. Es standen verschiedene Zellklone mit variablen transfizierten CRP-Promoterabschnitten zur Verfügung: Zum einen wurden HepG2-Zellen, die mit dem vollständigen „full length“ (fl) 1000 Basenpaare umfassenden CRP-Promoter und dem Gen der Luciferase stabil transfiziert waren verwendet. Diese wurden als HepG2-fl-p1000CRP/luciferase oder als HepG2-ABEK14-Zellen (Eigennamen) bezeichnet. Zum anderen wurden Zellkonstrukte, so genannte Deletionskonstrukte



eingesetzt, die mit den ersten 100, 150 bzw. 250 Basenpaaren des CRP-Promoters und dem Luciferasegen stabil transfiziert waren. Diese erhielten abhängig von der Länge der transfizierten CRP-Promotersequenz die Namen HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase bzw. HepG2-p250CRP/luciferase. Das an den Promoterabschnitten angehängte Gen der Luciferase fungierte in den nachfolgenden Versuchen als Reportergen und wurde zur Auswertung der Versuche benötigt. Bei Aktivierung des Promoters wird auch die Luciferase exprimiert. Dies kann mit Hilfe eines Chemolumineszenzassays quantitativ erfasst werden und erlaubt somit Rückschlüsse auf die Promoteraktivität.

### **2.2.1.3 Kultivierung von HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase**

Die verschiedenen Zellklone HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase wurden in HepG2-Medium bei 37° C unter 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Eine Passagierung erfolgte ungefähr einmal die Woche, um die Zellzahl konstant zu halten.

### **2.2.1.3 Splitten und Aussaat von HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase**

Vor dem Splitten der Zellen erfolgte der bereits unter 2.2.1.1 beschriebene Vorgang des Beschichtens der Wellplatten und Flaschen mit Kollagen I. Für HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase wurde die Verdünnung allerdings so gewählt, dass die Beschichtung mit 5 µg Kollagen I pro cm<sup>2</sup> erfolgte. Für jeden Versuch wurden pro Zellklon jeweils vier 24-Wellplatten und je zwei 96-Wellplatten benötigt, wobei bei der Versuchsauswertung nach 32 und 48 h die 24-Wellplatten zur Analyse der Promoteraktivität im Luciferase-Assay (s. 2.2.5), die 96-Wellplatten zu Vitalitätstests (s. 2.2.6) herangezogen wurden. Die restlichen

Zellen wurden für die Weiterführung der jeweiligen Zelllinie in T75-Flaschen verwendet. Vor Beginn des Splittvorgangs wurden Medium und PBS im Wasserbad bei 37° C und Trypsin (Lagerung bei 4° C) bei Raumtemperatur erwärmt.

Unter der Laminar Air Bench Flow wurde nun das überschüssige Medium aus den T75-Flaschen mit den jeweiligen Zellklonen abgesaugt und die Flaschen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 ml Trypsin, das die Aufgabe hatte, die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Nach fünf Minuten Inkubationszeit bei 37° C wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml Medium gestoppt. Danach wurde die Zellsuspension in ein Falcon überführt und bei 1250 U/min 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin abgesaugt und das Pellet in 2 ml Medium resuspendiert, schließlich wurden mischend weitere 8 ml Medium zugegeben. Mittels einer Zählkammer wurden die Zellen nun unter dem Mikroskop ausgezählt, wodurch auf die Gesamtzellzahl in 10 ml geschlossen werden konnte. Somit konnten die Zellen nun mit der gewünschten Zelldichte (Tab. 1) auf die zuvor beschichteten Wellplatten und Flaschen ausplattiert werden. Die Wellplatten wurden nun bei 37° C unter 5% CO<sub>2</sub> 24 h lang inkubiert, so dass die Zellen adherieren konnten. Anschließend konnte die Stimulation erfolgen.

### **2.2.2 Stimulation von Hepatozyten mit IL-6 und Behandlung mit Galiellalacton**

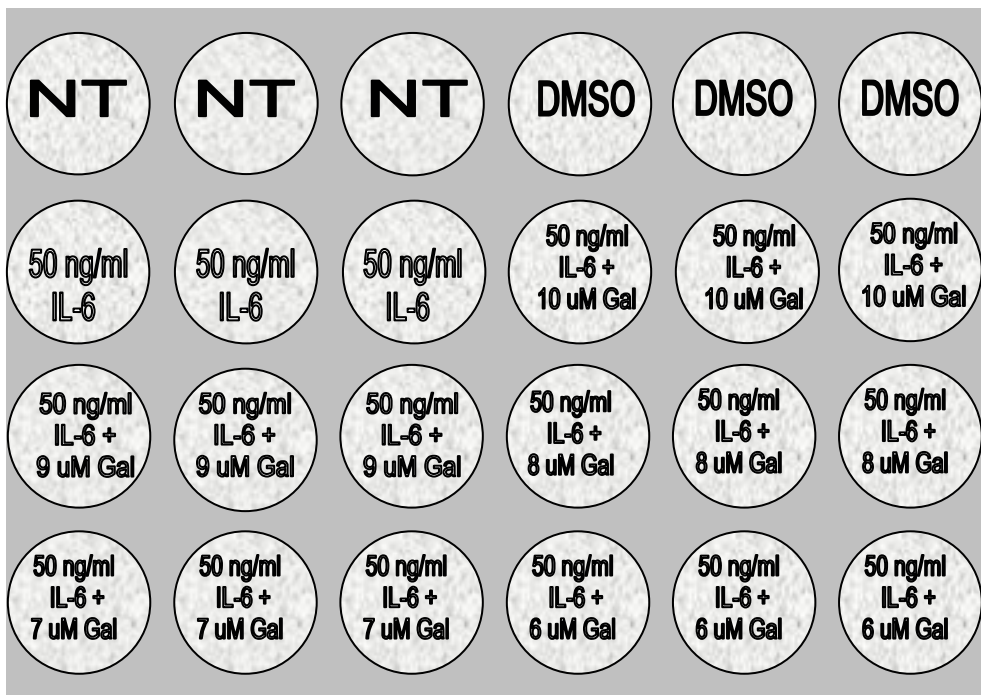
Um den Effekt von Galiellalacton zu ermitteln, wurden sowohl PKH als auch HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase mit Galiellalactonkonzentrationen von 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 µM behandelt und nach einer Stunde Inkubation mit 50 ng/ml IL-6 stimuliert. Für jeden Versuch wurden pro Zellart jeweils vier 24-Lochplatten mit der jeweiligen Zelllinie benötigt, da für jede Galiellalactonkonzentration 3-fach-Bestimmungen durchgeführt wurden und die Versuche nach 32 bzw. 48 h ausgewertet wurden. Außerdem wurden pro Versuch und für jede Zellart jeweils zwei 96-Wellplatten mit ausplattierten Zellen für die Versuchsauswertung nach 32 bzw. 48 h benötigt, wobei auf den 96-

## 2. Material und Methoden

---

Wellplatten mit 6-fach-Bestimmungen pro Galiellalactonkonzentration gearbeitet wurde.

Bei Versuchsauswertung nach 32 bzw. 48 h wurden die Überstände der 24-Wellplatten mit PKH abgenommen, um im CRP-ELISA quantitativ bestimmt zu werden (s. 2.2.4). Die Auswertung der 24-Wellplatten mit HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase erfolgte mittels Luciferase-Assay (s. 2.2.5). Die 96-Wellplatten beider Zellarten wurden zu Vitalitätstests herangezogen (s. 2.2.6).



**Abb. 7:** Darstellung einer 24-Lochplatte mit primären Kaninchenhepatozyten bei deren Behandlung 50 ng/ml Interleukin 6 (IL-6) und verschiedene Konzentrationen Galiellalacton (Gal) verwendet wurden. Es wurden jeweils 3-fach-Bestimmungen durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten nicht behandelte (NT) bzw. mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelte Zellen.

Bei der Durchführung der Stimulation wurden zuerst Galiellalactonkonzentrationen von 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1  $\mu$ M in Medium hergestellt. Nach Absaugen des Mediums wurde dann jeweils 1 ml der jeweiligen Konzentration auf die 24-Wellplatte (Abb. 7) bzw. 100  $\mu$ l auf die 96-Wellplatte pipettiert. Als Negativkontrolle

dienten Zellen, die nur mit Dimethylsulfoxid (DMSO) dem Lösungsmittel für Galiellalacton unter Weglassen von Zytokinen und Galiellalacton behandelt wurden. Dies erschien nötig, um einen eventuell durch DMSO erzeugten Effekt auszuschließen. Weitere Negativkontrolle bei Versuchen mit PKH und auf allen 96-Wellplatten waren ausschließlich mit Hepatozytenmedium behandelte Zellen (NT). Positivkontrolle bei allen verwendeten Zellenreihen waren Zellen, die ausschließlich mit 50 ng/ml IL-6 stimuliert wurden.

### **2.2.3 Qualitativer CRP-Nachweis in Überständen von PKH im Western Blot**

#### **2.2.3.1 Probengewinnung**

T75-Flaschen mit PKH wurden mit 100 ng/ml IL-6 stimuliert. Nach 24 bzw. 48 h wurden die Überstände abgenommen, um einen qualitativen CRP-Nachweis mittels Western Blot durchzuführen. Als Negativkontrolle dienten Überstände unbehandelter Zellen. Die Überstände konnten nach Abnahme eingefroren und bei -80° C gelagert werden.

#### **2.2.3.2 Ermittlung des Proteingehalts im Überstand mittels Proteinassay**

Der Proteingehalt von Überständen mit 100 ng/ml IL-6 stimulierten PKH und unbehandelten PKH wurde mit dem Bicinchoninsäure (BCA)-Test nach Pierce bestimmt. Grundlage dieses Tests ist die Reduktion von zweiwertigen Kupferionen durch Proteine zu einwertigen Kupferionen im alkalischen Milieu. Die einwertigen Kupferionen sind nun in der Lage einen violetten Farbkomplex mit BCA zu bilden, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm im Photometer bestimmt werden kann. Der Proteingehalt in den Proben korreliert hierbei mit der Extinktion. Mit Hilfe einer Standardkurve kann somit eine quantitative Proteinbestimmung spezifischer Proben erfolgen.

Zuerst wurden die eingefrorenen Proben langsam auf Eis aufgetaut. Parallel hierzu wurde das zur Komplexbindung nötige Farbreagenz hergestellt, indem Reagenz A (BCA/Tartrat im alkalischen Carbonat Puffer) und Reagenz B (Kupfersulfat) im Verhältnis 50:1 gemischt wurden.

## 2. Material und Methoden

---

Danach wurden die Proben für die Ermittlung der Standardkurven hergestellt. Hierzu wurden verschiedene Verdünnungen einer Lösung mit bovinem Serumalbumin (BSA) nach folgendem Schema hergestellt und in Eppendorf Cups pipettiert (Tab. 2):

**Tab. 2: Schema zur Ermittlung der Standardkurve bei der Proteinbestimmung nach Pierce mit Hilfe von bovinem Serumalbumin (BSA)**

mg Protein	ml 2 mg/ml BSA-Lösung	ml Aqua destilliert
0	0	50
20	10	40
40	20	30
60	30	20
80	40	10
100	50	0

5 µl der Proben, deren Proteingehalt bestimmt werden sollte, wurden jeweils mit 45 µl Aqua destilliert verdünnt. Anschließend wurden in alle Reaktionsgefäße 950 µl des vorher hergestellten Farbreagens zugegeben und gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37° C in einem Schüttelinkubator und kurzem Abkühlen der Proben im Kühlschrank wurde die Messung im Photometer bei 562 nm durchgeführt.

### 2.2.3.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zum qualitativen Proteinnachweis, wobei er in diesem Fall zum CRP-Nachweis im Überstand von mit 100 ng/ml IL-6 stimulierten PKH verwendet wurde. Zuerst wird ein Proteingemisch mittels Elektrophorese in einem Tris-Glycin-Gel aufgetrennt. Beim eigentlichen Blottingvorgang erfolgt anschließend durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eine Wanderung der Proteinbanden auf eine Membran, auf der das gesuchte Protein nun mit Hilfe spezifischer Antikörper im Rahmen der Immundetektion nachgewiesen werden kann.

## 2. Material und Methoden

---

Als erstes wurde das Tris-Glycin Gel für die Elektrophorese vorbereitet und in die Halterung der Elektrophoresekammer eingespannt. Geltaschen und Kammer wurden mit Laufpuffer (einfach) gefüllt, der in zehnfacher Konzentration gelagert wurde und somit 1:10 mit Aqua verdünnt werden musste. Wichtig bei der Befüllung war die Vermeidung von Luftblasen, um später eine gleichmäßige Wanderung der Proteinbanden zu gewährleisten.

Danach wurden die auf Eis gelagerten Proben für das Auftragen in die Gelkammern vorbereitet. Unter dem Abzug wurden 150 µl des zuvor hergestellten Probenpuffers mit 50 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Danach wurde die in der Proteinbestimmung ermittelte Probenmenge mit soviel Probenpuffer vermischt, dass insgesamt 20 µl zum Auftragen bereit standen. Als Positivkontrolle wurde humanes CRP-Serum und CRP Referenzserum rabbit 1:2 verwendet, die wie auch der Marker mit Probenpuffer versetzt wurden. Nachdem 10 min eine Proteindenaturierung der Proben bei 95° C durchgeführt wurde, wurden diese 10 min auf Eis gelagert und kurz zentrifugiert. Nun konnten sie mit großer Sorgfalt in die Taschen der Gelkammer pipettiert werden. Die anschließende Elektrophorese wurde bei 110 Volt und 400 mAmpere ca. 2 h durchgeführt.

Danach wurde das Gel vorsichtig aus der Gelkassette entfernt und in Transferpuffer gelegt. Währenddessen wurde die Blottingkammer vorbereitet, indem sechs Blätter 3MM-Blotting-Papier und eine Nitrozellulosemembran zurechtgeschnitten und anschließend mit Transferpuffer befeuchtet wurden. Es wurde ein Stapel aus drei Blättern 3MM-Blotting-Papier, der Blottingmembran, dem Gel und drei weiteren Blättern 3MM-Blotting-Papier aufgeschichtet, wobei darauf zu achten war, dass dieser möglichst luftblasenfrei aufgebaut wurde. Zu diesem Zweck wurde mit einer Einmalpipette vorsichtig über den Stapel gerollt. Bei einem Stromfluss von 400 mAmpere und Spannung von 10 Volt kam es nach 40 min zum Transfer der Proteinbanden vom Gel auf die Membran.

In der angeschlossenen Immundetektion sollte CRP nun mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Hintergrund der Immundetektion ist die Verwendung zweier Antikörper, wobei der Erstantikörper spezifisch an CRP bindet. Der Zweitantikörper hat die Eigenschaft an das Fc-Fragment des ersten zu binden und mit dem daran angehängten Enzym Horse Radish Peroxidase (HRP)

bei Zugabe eines geeigneten Substrats eine nachfolgende Chemolumineszenzreaktion zu katalysieren. Das bei dieser Reaktion freigesetzte Licht führt zur Schwärzung eines Films, wodurch die antikörpergebundenen Proteine sichtbar gemacht werden können.

Nach dem Blotting wurde die Membran erst eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf der Wippe in einer 3%-igen Milchpulver/PBS-Lösung gewaschen. Danach wurde die Membran in 10 ml einer 0,3%-igen Milchpulver/PBS-Lösung gelegt, die den Erstantikörper Chicken-Anti-Rabbit-CRP mit der Verdünnung 1:2000 enthielt und bei 4 ° C für 48 h gewippt.

Nach einem 3 x 10 min dauernden Waschvorgang mit TBS/Tween bei Raumtemperatur wurde der 2. Antikörper Ziege-Anti-Chicken-HRP in einer Verdünnung von 1:5000 ebenfalls in 10 ml 0,3%-iger Milchpulver/PBS-Lösung hergestellt, wobei die Membran eine Stunde in dieser Lösung verblieb. Zur Detektion wurde eine Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Lösung verwendet, die als Substrat für die HRP diente, und in der die Membran nach einem nochmaligen Waschvorgang 3 x 10 min mit TBS/Tween eine Minute inkubiert wurde. Die Membran wurde danach unter die Folie einer Filmkassette gebracht und ein Film wurde in der Dunkelkammer darüber gelegt. Nach variablen Entwicklungszeiten, die zu einer unterschiedlichen Filmschwärzung führten, konnten die Filme mit dem bereitstehenden Gerät entwickelt werden.

### **2.2.4 Quantitative CRP-Bestimmung in Überständen von PKH im CRP-ELISA**

Der CRP-ELISA ist ein sehr sensibles quantitatives Nachweisverfahren für die CRP-Konzentration in Kaninchenplasma, Serum oder ähnlichen Flüssigkeiten. Im vorliegenden Fall sollte CRP quantitativ in den Überständen der vorher mit IL-6 stimulierten und mit Galiallacton behandelten PKH nach 32 bzw. 48 h bestimmt werden (s. 2.2.2).

Im Folgenden soll das Prinzip des ELISA erklärt werden. Die Oberfläche der Mikrotiter Wellplatte ist mit anti-CRP-Antikörper beschichtet, welcher das in den Proben enthaltene CRP bei Zugabe bindet. Anschließend wird ein anti-CRP Antikörper zugegeben, der mit dem Enzym HRP konjugiert ist. Dieser Antikörper

## 2. Material und Methoden

---

bindet an CRP und setzt nun mit Hilfe der angehängten HRP das zugegebene Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) um. Durch Zugabe von schwefeliger Säure wird die Reaktion schließlich gestoppt und die nach Zusatz von TMB blau erschienene Lösung färbt sich nun gelb. Absorptionsmessungen bei 450 nm lassen nun auf die Menge an umgesetztem Substrat schließen, die wiederum von der Menge der Anzahl der gebundenen Enzyme und somit letztendlich vom gebundenen CRP abhängt. Die gemessene Extinktion ist somit proportional zur CRP-Menge in den Proben.

Vor Durchführung des eigentlichen Tests wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht. Die im Kit enthaltene Waschlösung wurde 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt, das Enzym-Antikörper-Konjugat 1:100 mit dem mitgelieferten Diluent. Danach wurden die Standards 1, 2, 3, 4, 5 und 6 mit Hilfe des mitgelieferten Rabbit CRP Kalibrators hergestellt (Tab. 3).

**Tab. 3: Pipettierschema zur Herstellung der verschiedenen Standardkonzentrationen, welche bei der Ermittlung einer Standardkurve des C-reaktiven Proteins (CRP) benötigt wurden.**

Standard	Konzentration (ng/ml)	Kalibrator Volumen	Diluent
1	200	200 µl Rabbit CRP	320 µl
2	100	250 µl Calibrator 1	250 µl
3	50	250 µl Calibrator 2	250 µl
4	25	250 µl Calibrator 3	250 µl
5	12,5	250 µl Calibrator 4	250 µl
6	6,25	250 µl Calibrator 5	250 µl

Nun wurden je 2 x 100 µl (Doppelbestimmungen) der Standards, der mitgelieferten Positivkontrolle und Diluent, welches als Leerwert diente, sowie natürlich auch der zu bestimmenden Proben auf die Microtiter Platte pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Platte komplett abgesaugt und vier Mal mit der zuvor verdünnten Waschlösung gewaschen. Anschließend wurden 100 µl des Enzym-Antikörper-Konjugats mit der Multipipette



auf jedes Well pipettiert. Die anschließende Inkubation erfolgte abermals 30 min bei Raumtemperatur diesmal bei Dunkelheit. Nach der Wiederholung des viermaligen Waschvorgangs und dem Pipettieren von 100 µl TMB in jedes Well wurde noch einmal fünf Minuten im Dunkeln inkubiert, bevor 100 µl der Stopplösung zugegeben wurden. Die Absorption jedes Wells konnte nun bei 450 nm innerhalb der nächsten zwei Stunden im ELISA-Reader ermittelt werden.

### **2.2.5 Luciferase-Assay bei HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase zur Bestimmung der CRP-Promoteraktivität**

Der Luciferase-Assay ist eine Methode zum Nachweis der Promoteraktivität von Zellen. Grundlage ist die durch das Enzym Luciferase katalysierte oxydative Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin, die mit Hilfe von Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und unter Spaltung von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosinmonophosphat (AMP) abläuft und neben der Entstehung von CO<sub>2</sub> und Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>) zum Freiwerden von Licht führt:



Das frei werdende Licht kann anschließend quantitativ im Luminometer gemessen werden und entspricht der transkriptionellen Aktivität im Zellkern.

Untersucht wurde die CRP-Promoteraktivität in HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase nach Behandlung mit Galactose und anschließender Stimulation mit 50 ng/ml IL-6 (s. 2.2.2) 32 bzw. 48 h nach Stimulation. Zuerst wurden die Überstände der 24-Wellplatten abgesaugt und einmal mit PBS gewaschen. Zum Lösen der Zellen wurden dann auf jedes Well 100 µl des im Bright-Glo Luciferase Assay System KIT enthaltenem Glow Lysis Buffer pipettiert und die Platte 5 - 10 min bei 4 °C wippend inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl/Well ebenfalls im Bright-Glo Luciferase Assay System KIT enthaltenem Bright Glow Assay Buffer wurden die Zellen mit einer Pipette vom Plattenboden abgekratzt,

resuspendiert und die Suspension blasenfrei in ein Reagenzglas transferiert. Die Messung konnte nun bei 554 nm erfolgen.

### **2.2.6 Vitalitätstests mit PKH, HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase**

Um eine Aussage über die Toxizität von Galiellalacton treffen zu können, wurden Zellvitalitätstests durchgeführt. Grundlage hierbei ist die gleiche Reaktion wie beim Luciferase-Assay. Allerdings ist eine stabile Transfektion des Luciferasegens an die zu untersuchende Zelllinie in diesem Fall keine Voraussetzung, da das Enzym im verwendeten Reagenz enthalten ist. Entscheidend bei dieser Reaktion ist das Vorhandensein von ATP, das nur von lebenden Zellen bereitgestellt werden kann. Die Reaktion ist somit ein Nachweis für die Vitalität der Zellen.

Verwendet wurden 96-Wellplatten mit PKH, HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase nach Behandlung mit Galiellalacton und 50 ng/ml IL-6 (s. 2.2.2). Nach 32 bzw. 48 h wurden die Platten und das CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay KIT, bestehend aus CellTiter-Glo Buffer und CellTiter-Glo Substrat, eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Mit einer Spritze wurde dann der flüssige CellTiter-Glo Buffer herausgezogen und in die Flasche mit dem pulverförmigen CellTiter-Glo Substrat transferiert. Nach suffizientem Mischen wurden mit der Multipipette 100 µl des Gemisches in jedes Loch zugegeben, so dass ein Farbumschlag von rot nach gelb erfolgte. Nach einem zweiminütigen Mischvorgang der Platte auf dem Schüttelinkubator und einer anschließenden Inkubationszeit von zehn min bei Raumtemperatur erfolgte die Messung im Luminometer.

### **2.2.7 Statistik**

Im CRP-ELISA mit Überständen von PKH sowie im Luciferase-Assay mit HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase erfolgten jeweils 3-fach-Bestimmungen, bei den Vitalitätstests wurden jeweils 6-fach-Bestimmungen durchgeführt. Außerdem

## 2. Material und Methoden

---

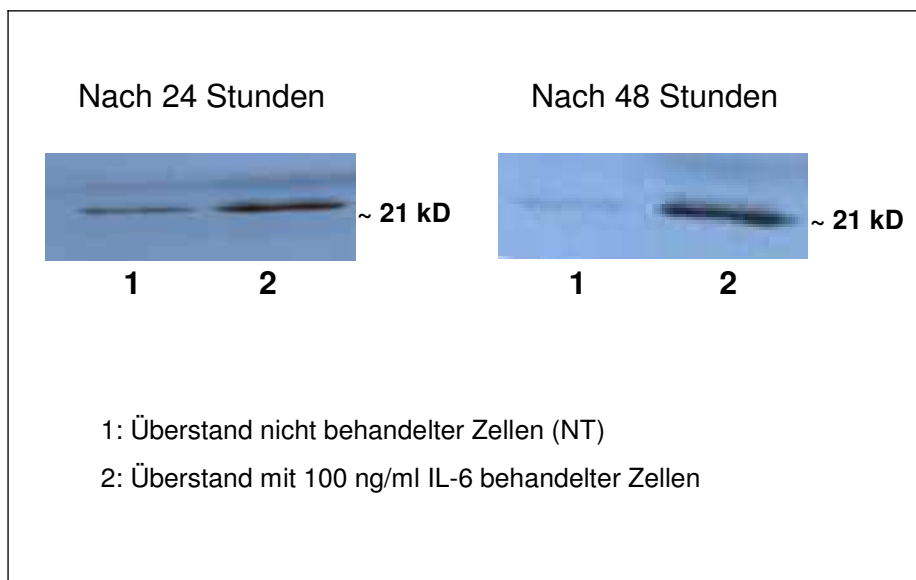
wurden bei allen Tests jeweils  $n = 3$  Versuche zusammengefasst. Die statistische Auswertung wurde unter Zuhilfenahme der Software SigmaStat 2.0 durchgeführt. Bestimmt wurden signifikante Werte mit dem paired t-Test, wobei  $p < 0,05$  als statistisch signifikant gewertet wurde.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Versuchsergebnisse zu PKH

##### 3.1.1 Qualitativer CRP-Nachweis in Überständen von PKH im Western Blot

Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden im Western Blot die Überstände von nicht stimulierten bzw. mit 100 ng/ml IL-6 stimulierten PKH auf das Vorhandensein von CRP untersucht. Hierbei konnte CRP qualitativ nachgewiesen werden (Abb. 8).



**Abb. 8: Qualitativer Nachweis des C-reaktiven Proteins in Überständen von primären Kaninchenhepatozyten nach 24 bzw. 48 Stunden im Western Blot (Abkürzung: kD: kiloDalton)**

#### **3.1.2 Quantitative CRP-Bestimmung in Überständen von PKH im CRP-ELISA nach Behandlung mit Galiellalacton**

Wie in 2.2.2 beschrieben wurden PKH mit Galiellalactonkonzentrationen von 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10  $\mu\text{M}$  behandelt und nach einer Stunde Inkubationszeit mit 50 ng/ml IL-6 stimuliert. Nach 32 bzw. 48 h wurden die Überstände abgenommen und die darin enthaltene Menge an C-reaktiven Protein im CRP-ELISA wie unter 2.2.4 beschrieben quantitativ mit dem Ziel bestimmt CRP-Konzentrationen in Abhängigkeit unterschiedlicher Galiellalactonkonzentrationen zu ermitteln. Die statistische Auswertung der CRP-Konzentrationen erfolgte nach drei Versuchen im paired t-Test in Referenz zu mit 50 ng/ml IL-6 stimulierten Zellen. Der Test wurde zum einen für absolute (Abb. 9), zum anderen für in Relation zu CRP-Konzentrationen von mit 50 ng/ml IL-6 stimulierten Zellen prozentuale CRP-Konzentrationen (Abb. 10) durchgeführt. Angegeben sind in allen nachfolgenden Versuchsauswertungen die Mittelwerte aus drei Versuchen mit der zugehörigen Standardabweichung. Signifikante p-Werte sind in Klammern dahinter angegeben, wobei ns für nicht signifikant steht.

Im Vergleich mit ausschließlich mit 50 ng/ml IL-6 stimulierten Zellen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der CRP-Konzentrationen bei steigenden Galiellalactonkonzentrationen sowohl nach 32 als auch nach 48 h.

Die gemessene absolute CRP-Konzentration für unbehandelte Zellen betrug 4,85 ng/ml  $\pm$  4,75 ng/ml ( $p < 0,05$ ) und stieg 32 h nach Behandlung mit 50 ng/ml IL-6 auf 58,18 ng/ml  $\pm$  24,01 ng/ml. Für mit DMSO behandelte Zellen ergab sich ein Wert von 4,33 ng/ml  $\pm$  4,06 ng/ml ( $p = 0,05$ ). Bei Behandlung der Überstände von PKH mit einer Galiellalactonkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  ergab sich ein Wert von 57,70 ng/ml  $\pm$  29,56 ng/ml (ns), bei 2  $\mu\text{M}$  einer von 53,77 ng/ml  $\pm$  33,96 ng/ml (ns), bei 3  $\mu\text{M}$  72,44 ng/ml  $\pm$  49,98 ng/ml (ns), bei 4  $\mu\text{M}$  52,73 ng/ml  $\pm$  34,47 ng/ml (ns), bei 5  $\mu\text{M}$  51,27 ng/ml  $\pm$  35,85 ng/ml (ns). Ab einer Behandlung mit 6  $\mu\text{M}$  Galiellalacton ließ sich eine statistisch signifikante Abnahme der absoluten CRP-Konzentration ermitteln, wobei diese bei 6  $\mu\text{M}$  Galiellalacton auf 30,82 ng/ml  $\pm$  22,39 ng/ml ( $p < 0,05$ ) fiel, bei 7  $\mu\text{M}$  sank sie auf 14,09 ng/ml  $\pm$  9,54 ng/ml ( $p < 0,05$ ), bei 8  $\mu\text{M}$  auf

### 3. Ergebnisse

9,50 ng/ml  $\pm$  7,21 ng/ml ( $p < 0,05$ ), bei 9  $\mu$ M auf 4,87 ng/ml  $\pm$  4,54 ng/ml ( $p < 0,05$ ) und bei 10  $\mu$ M auf 3,84 ng/ml  $\pm$  3,51 ng/ml ( $p < 0,05$ ).

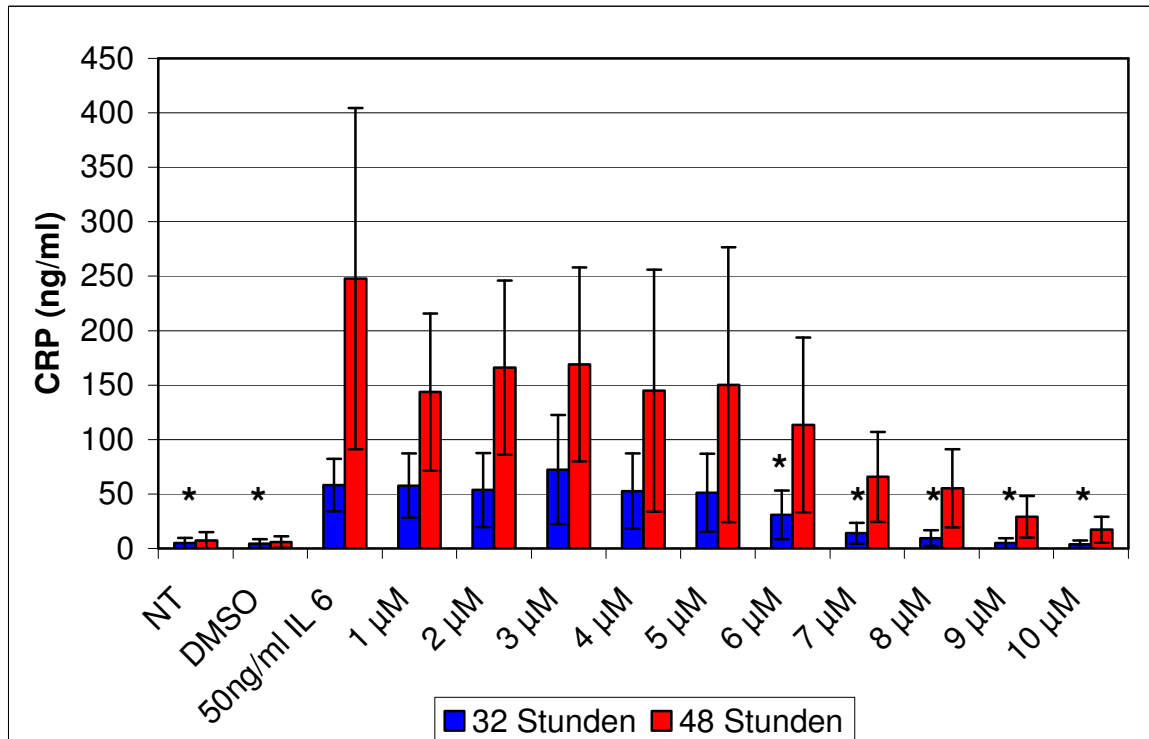


Abb. 9: Absolute Konzentrationen des C-reaktiven Proteins (CRP) in Überständen von mit 50 ng/ml Interleukin 6 (IL-6) stimulierten primären Kaninchenhepatozyten nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Galiellalacton nach 32 bzw. 48 h. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Zellen (NT) und mit dem Lösungsmittel für Galiellalacton Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelte Zellen eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit entsprechenden Standardabweichungen. Signifikanzberechnungen wurden jeweils auf mit 50 ng/ml IL-6 stimulierte Zellen angewandt und sind mit \* ( $p \leq 0,05$ ) gekennzeichnet.

Nach 48 h ergab sich für mit 50 ng/ml IL-6 stimulierte Zellen eine CRP-Konzentration von 247,83 ng/ml  $\pm$  156,75 ng/ml, verglichen hiermit ergab sich für unstimulierte Zellen eine CRP-Konzentration von 7,27 ng/ml  $\pm$  7,68 ng/ml (ns) und für mit DMSO stimulierte ein Wert von 5,83 ng/ml  $\pm$  5,22 ng/ml (ns). Bei gleichzeitiger Behandlung der mit IL-6 stimulierten Überstände mit 1  $\mu$ M

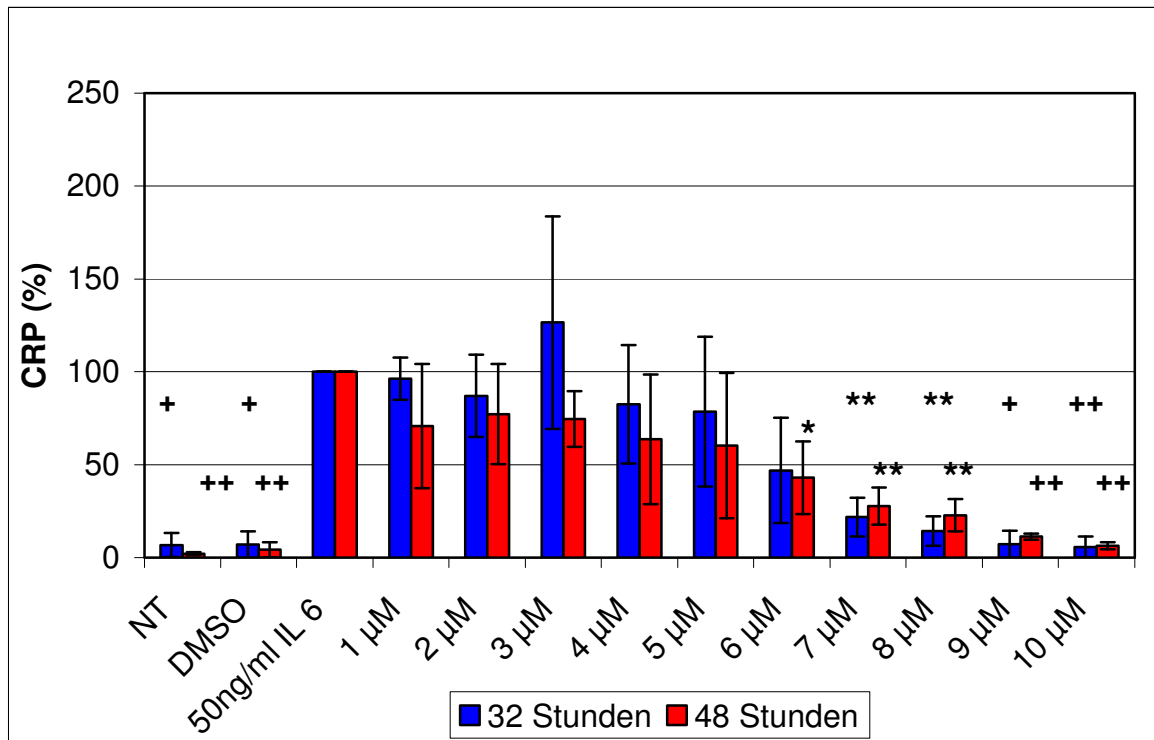
### 3. Ergebnisse

---

Galiellalacton kam es zu einem Abfall der CRP-Konzentration auf 143,59 ng/ml  $\pm$  72,17 ng/ml (ns), bei Verwendung von 2  $\mu$ M auf 166,12 ng/ml  $\pm$  79,94 ng/ml (ns), bei 3  $\mu$ M auf 169,04 ng/ml  $\pm$  89,03 ng/ml (ns), bei 4  $\mu$ M auf 144,83 ng/ml  $\pm$  111,10 ng/ml (ns), bei 5  $\mu$ M auf 150,24 ng/ml  $\pm$  126,21 ng/ml (ns), bei 6  $\mu$ M auf 113,42 ng/ml  $\pm$  80,25 ng/ml (ns), bei 7  $\mu$ M auf 65,77 ng/ml  $\pm$  41,33 ng/ml (ns), bei 8  $\mu$ M auf 55,20 ng/ml  $\pm$  35,93 ng/ml (ns), bei 9  $\mu$ M auf 29,12 ng/ml  $\pm$  19,07 ng/ml (ns) und bei 10  $\mu$ M auf 17,20 ng/ml  $\pm$  12,03 ng/ml (ns).

Bei Betrachtung prozentualer CRP-Konzentrationen (Abb. 10) ergab sich nach 32 h für unbehandelte Zellen ein Wert von 6,78%  $\pm$  6,48% ( $p = 0,002$ ), für mit DMSO behandelte Zellen 6,98%  $\pm$  7,09% ( $p = 0,002$ ). In Relation zu ausschließlich mit 50 ng/ml IL-6 stimulierten Zellen sank die CRP-Konzentration nach 32 h bei einer Galiellalactonkonzentration von 1  $\mu$ M auf 96,23%  $\pm$  11,33% (ns), bei 2  $\mu$ M auf 87,03%  $\pm$  22,12% (ns), bei 3  $\mu$ M betrug sie 126,51%  $\pm$  57,25% (ns), bei 4  $\mu$ M 82,43%  $\pm$  31,86% (ns), bei 5  $\mu$ M 78,52%  $\pm$  40,26% (ns), bei 6  $\mu$ M 46,87%  $\pm$  28,34% (ns). Statistisch signifikant wurde die Abnahme bei einer Galiellalactonkonzentration von 7  $\mu$ M und reduzierte sich hier auf 21,78%  $\pm$  10,44% ( $p < 0,01$ ), bei 8  $\mu$ M auf 14,24%  $\pm$  7,94% ( $p < 0,01$ ), bei 9  $\mu$ M auf 7,22%  $\pm$  7,33% ( $p = 0,002$ ) und bei 10  $\mu$ M auf 5,66%  $\pm$  5,63% ( $p = 0,001$ ).

Nach 48 h ergab sich für unbehandelte Zellen eine CRP-Konzentration von 2,14%  $\pm$  0,72% ( $p < 0,001$ ) und für mit DMSO behandelte ein Wert von 4,24%  $\pm$  4,05% ( $p < 0,001$ ). Nach Behandlung mit 1  $\mu$ M Galiellalacton sank die CRP-Konzentration auf 70,76%  $\pm$  33,35% (ns), bei Verwendung von 2  $\mu$ M auf 77,15%  $\pm$  26,95% (ns), bei 3  $\mu$ M auf 74,55%  $\pm$  14,94% (ns), bei 4  $\mu$ M auf 63,62%  $\pm$  34,89% (ns), bei 5  $\mu$ M sank sie auf 60,22%  $\pm$  39,07% (ns) des Ausgangswerts. Zu einer signifikanten Reduktion der CRP-Konzentration auf 43,03%  $\pm$  19,53% ( $p < 0,05$ ) kam es bei einer Galiellalactonkonzentration von 6  $\mu$ M, bei 7  $\mu$ M auf 27,69%  $\pm$  10,02% ( $p < 0,01$ ), bei 8  $\mu$ M auf 22,80%  $\pm$  8,73% ( $p < 0,01$ ), sowie bei 9  $\mu$ M auf 11,33%  $\pm$  1,67% ( $p < 0,001$ ) und 10  $\mu$ M auf 6,37%  $\pm$  1,92% ( $p < 0,001$ ). Die ermittelte halbmaximale Hemmkonzentration  $IC_{50}$  lag damit sowohl nach 32 als auch nach 48 h bei 5 – 6  $\mu$ M.



**Abb. 10: Prozentuale Konzentrationen (in Relation zu mit Interleukin 6 stimulierten Zellen) des C-reaktiven Proteins (CRP) in Überständen von mit 50 ng/ml Interleukin 6 (IL-6) stimulierten primären Kaninchenhepatozyten nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Galiellalacton nach 32 bzw. 48 h. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Zellen (NT) und mit dem Lösungsmittel für Galiellalacton Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelte Zellen eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit entsprechenden Standardabweichungen. Signifikanzberechnungen wurden jeweils auf mit 50 ng/ml IL-6 stimulierte Zellen angewandt und sind folgendermaßen gekennzeichnet:**

\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; +:  $p = 0,002$ ; ++:  $p \leq 0,001$

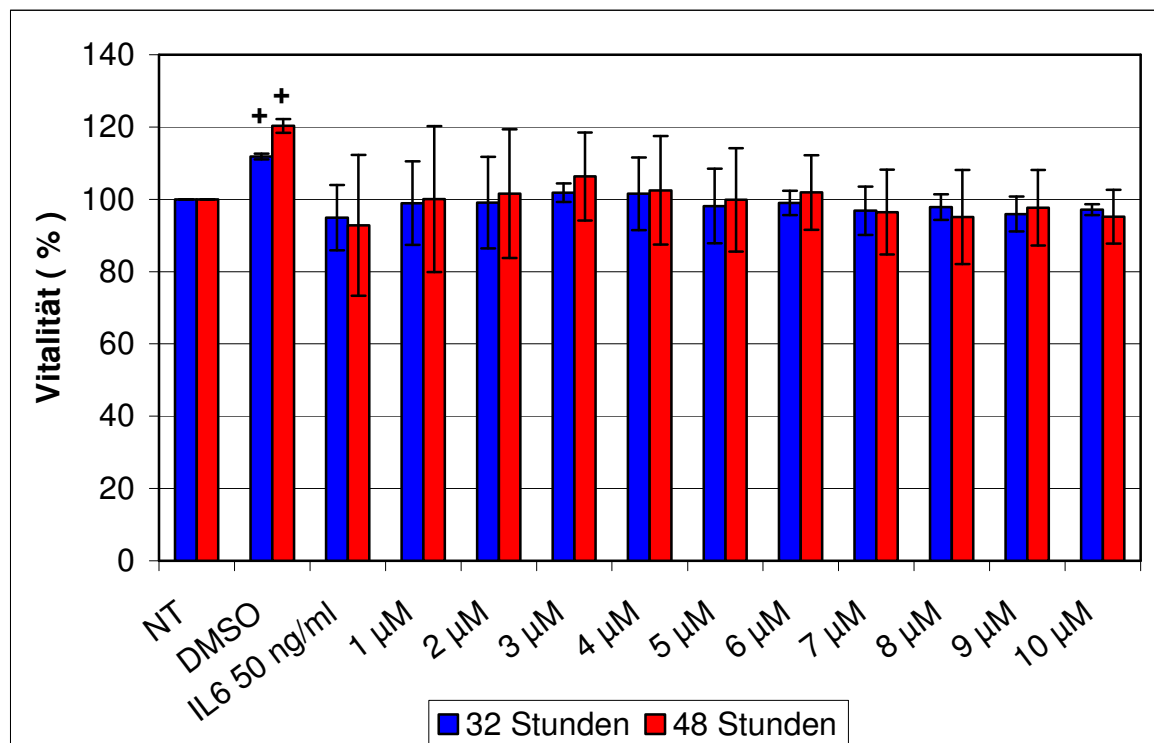
### 3.1.3 Vitalität von PKH nach Behandlung mit Galiellalacton

Um toxische Effekte von Galiellalacton aufzuzeigen, die auch zu einer Verfälschung der Ergebnisse beitragen hätten können, wurden für PKH die unter 2.2.6 beschriebenen Vitalitätstests durchgeführt. Die Vitalität der Zellen bei Galiellalactonkonzentrationen von 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 µM wurde in Relation zu unbehandelten, d.h. ausschließlich mit Hepatozytenmedium behandelten Zellen



### 3. Ergebnisse

(NT) angegeben, die als Negativkontrolle dienten. Auch die durchgeführten Signifikanzberechnungen erfolgten nach drei Versuchen und wurden auf unbehandelte Zellen angewandt.



**Abb. 11: Vitalität primärer Kaninchenhepatozyten nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Galiellalacton in Relation zu unbehandelten (NT) Zellen nach 32 bzw. 48 h. Aufgeführt sind außerdem noch ausschließlich mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen in Relation zu unbehandelten Zellen (NT) mit entsprechenden Standardabweichungen. Signifikanzberechnungen wurden jeweils auf unbehandelte Zellen angewandt und sind mit + ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet.**

Für mit DMSO behandelte PKH konnte eine signifikante Vitalitätszunahme nach 32 h auf  $111,86\% \pm 0,88\%$  ( $p < 0,01$ ) und nach 48 h auf  $120,33\% \pm 2,31\%$  ( $p < 0,01$ ) berechnet werden. Für alle verwendeten Galiellalactonkonzentrationen sowohl nach 32 als auch nach 48 h zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Zellen keine signifikante Zu- oder Abnahme der Vitalität. Aus Gründen der

Übersicht sind die nicht signifikanten Werte ausschließlich graphisch dargestellt (Abb. 11).

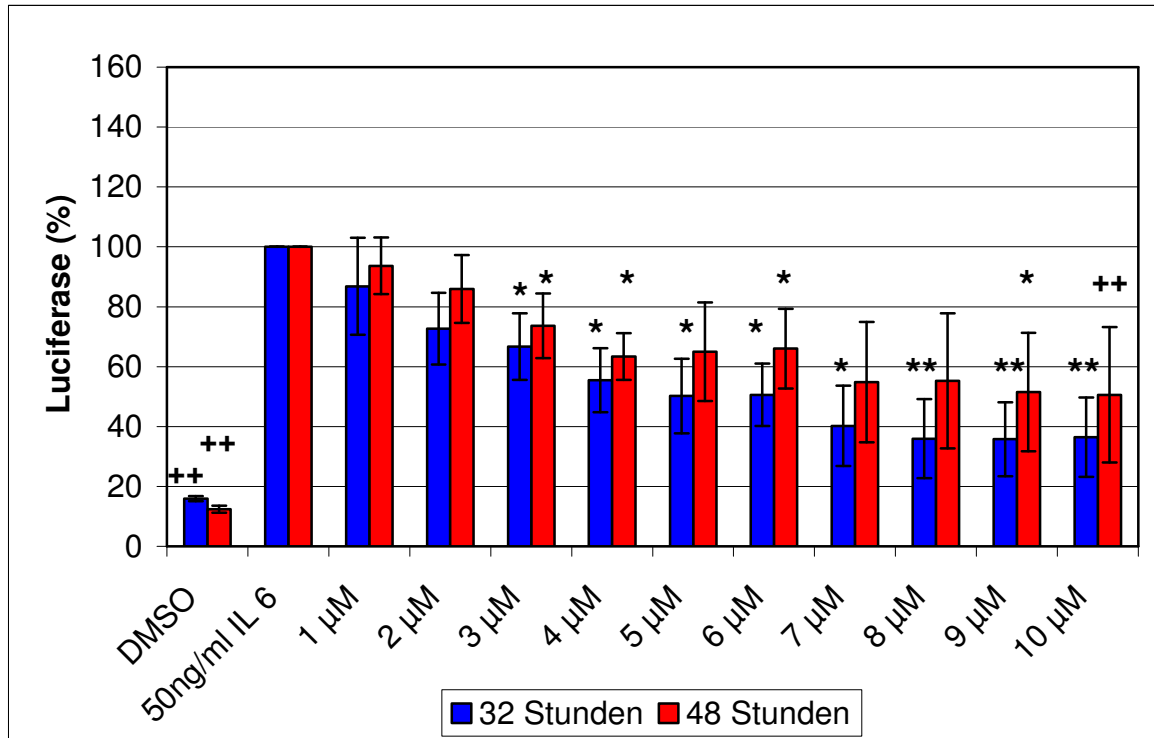
### **3.2 Versuchsergebnisse zu HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase**

#### **3.2.1 Analyse der Promoteraktivität von HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase nach Behandlung mit Galiellalacton**

Um genauere Aussagen über die am Wirkmechanismus von Galiellalacton beteiligten DNA-Sequenzen des CRP-Promoters treffen zu können, wurden HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase wie in 2.2.2 beschrieben mit Galiellalactonkonzentrationen von 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10  $\mu$ M behandelt und nach einer Stunde Inkubationszeit mit 50 ng/ml IL-6 stimuliert. Im nach 32 bzw. 48 h angeschlossenen unter 2.2.5 beschriebenen Luciferase-Assay wurde die Promoteraktivität analysiert. Die Luciferaseaktivität wurde prozentual in Relation zu mit 50 ng/ml IL-6 stimulierten Zellen nach 32 und 48 h in Abhängigkeit zu verschiedenen Konzentrationen Galiellalacton dargestellt und ausgewertet. Als Negativkontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen verwendet. Signifikanzberechnungen wurden nach drei Versuchen im paired t-Test in Referenz zu mit 50 ng/ml IL-6 stimulierten Zellen durchgeführt.

##### **3.2.1.1 HepG2-fl-p1000CRP/luciferase**

Nach Behandlung mit Galiellalacton zeigte sich für den Zellklon HepG2-fl-p1000CRP/luciferase mit steigenden Galiellalactonkonzentrationen eine konzentrationsabhängige Abnahme der Luciferaseaktivität in Referenz zu mit 50 ng/ml IL-6 stimulierten Zellen nach 32 und nach 48 h (Abb. 12).



**Abb. 12: Luciferase-Assay mit HepG2-fl-p1000CRP/luciferase: Transkriptionelle Aktivität des mit Interleukin 6 (IL-6) stimulierten Zellklons HepG2-fl-p1000CRP/luciferase in Abhängigkeit von verschiedenen Galiellalactonkonzentrationen nach 32 bzw. 48 h. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem Lösungsmittel für Galiellalacton Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt wurden. Dargestellt sind hier die Mittelwerte aus drei Versuchen in Relation zu mit IL-6 stimulierten Zellen mit entsprechenden Standardabweichungen. Signifikanzberechnungen wurden jeweils auf mit 50 ng/ml IL-6 stimulierte Zellen angewandt und sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p = 0,01$ ; ++:  $p < 0,001$  (Abkürzungen: HepG2: Hepatomzelllinie G2, fl: full length, CRP: C-reaktives Protein)**

Nach 32 h betrug die Promoteraktivität für ausschließlich mit DMSO behandelte Zellen  $15,92\% \pm 0,87\%$  ( $p < 0,001$ ), was bedeutet dass es nach Stimulation mit 50 ng/ml IL-6 zu einer Versechsfachung der Promoteraktivität kam. Bei Behandlung mit 1 µM Galiellalacton sank diese auf  $86,83\% \pm 16,19\%$  (ns) und bei 2 µM auf  $72,71\% \pm 11,96\%$  (ns) des Ausgangswertes. Signifikante Werte konnten ab einer Galiellalactonkonzentration von 3 µM ermittelt werden, wobei die Promoteraktivität hier auf  $66,65\% \pm 11,12\%$  ( $p < 0,05$ ) sank. Bei 4 µM fiel sie auf  $55,47\% \pm 10,66\%$

### 3. Ergebnisse

---

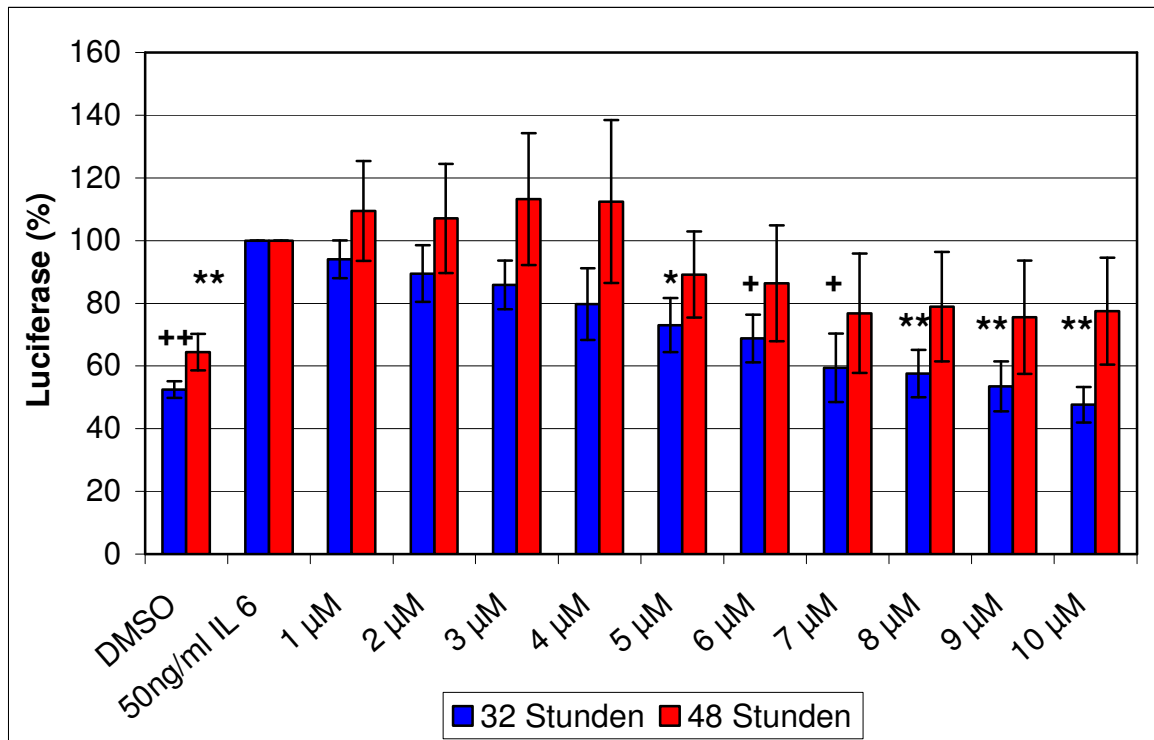
( $p < 0,05$ ), bei 5  $\mu\text{M}$  auf  $50,19\% \pm 12,42\%$  ( $p < 0,05$ ), bei 6  $\mu\text{M}$  auf  $50,57\% \pm 10,43\%$  ( $p < 0,05$ ), bei 7  $\mu\text{M}$  auf  $40,23\% \pm 13,44\%$  ( $p < 0,05$ ), bei 8  $\mu\text{M}$  auf  $35,96\% \pm 13,15\%$  ( $p = 0,01$ ), bei 9  $\mu\text{M}$  auf  $35,76\% \pm 12,39\%$  ( $p = 0,01$ ) und bei 10  $\mu\text{M}$  auf  $36,44\% \pm 13,23\%$  ( $p = 0,01$ ) des Ausgangswertes. Die ermittelte  $\text{IC}_{50}$  nach 32 h lag somit bei ca. 5 – 6  $\mu\text{M}$ .

Nach 48 h (Abb. 12) betrug die Promoteraktivität von mit DMSO behandelten Zellen verglichen mit 50 ng/ml IL-6 stimulierten Zellen  $12,40\% \pm 1,16\%$  ( $p < 0,001$ ), was auf eine Verachtfachung nach Stimulation schließen lässt. Bei Behandlung von HepG2-fl-p1000CRP/luciferase mit 1  $\mu\text{M}$  Galiellalacton sank die Promoteraktivität auf  $93,68\% \pm 9,42\%$  (ns), bei 2  $\mu\text{M}$  auf  $85,94\% \pm 11,28\%$  (ns). Bei Verwendung von 3  $\mu\text{M}$  Galiellalacton kam es zu einer signifikanten Hemmung der Luciferaseaktivität auf  $73,66\% \pm 10,77\%$  ( $p = 0,05$ ), bei 4  $\mu\text{M}$  auf  $63,37\% \pm 7,84\%$  ( $p < 0,05$ ), bei 5  $\mu\text{M}$  sank sie auf  $64,96\% \pm 16,44\%$  (ns), bei 6  $\mu\text{M}$  auf  $66,00\% \pm 13,28\%$  ( $p < 0,05$ ), bei 7  $\mu\text{M}$  auf  $54,83\% \pm 20,10\%$  (ns), bei 8  $\mu\text{M}$  auf  $55,25\% \pm 22,55\%$  (ns), bei 9  $\mu\text{M}$  auf  $51,49\% \pm 19,78\%$  ( $p = 0,05$ ) und bei 10  $\mu\text{M}$  auf  $50,57\% \pm 22,60\%$  ( $p < 0,001$ ). Die  $\text{IC}_{50}$  nach 48 h lag somit bei ca. 10  $\mu\text{M}$ .

#### 3.2.1.2 HepG2-p100CRP/luciferase

Beim Luciferase-Assay mit HepG2-p100CRP/luciferase nach 32 h betrug die ermittelte Luciferaseaktivität für mit DMSO behandelte Zellen  $52,47\% \pm 2,69\%$  ( $p < 0,001$ ), d.h. nach Stimulation mit 50 ng/ml IL-6 war sie doppelt so hoch. Nach Behandlung mit Galiellalacton zeigte sich nach 32 h bei steigenden Galiellalactonkonzentrationen eine konzentrationsabhängige Abnahme der Luciferaseaktivität. Diese betrug bei Verwendung von 1  $\mu\text{M}$  Galiellalacton  $94,02\% \pm 6,05\%$  (ns), bei 2  $\mu\text{M}$  auf  $89,48\% \pm 9,03\%$  (ns), bei 3  $\mu\text{M}$  auf  $85,90\% \pm 7,75\%$  (ns), bei 4  $\mu\text{M}$  auf  $79,75\% \pm 11,40\%$  (ns). Eine statistisch signifikante Abnahme auf  $73,06\% \pm 8,62\%$  ( $p < 0,05$ ) ergab sich bei einer Galiellalactonkonzentration von 5  $\mu\text{M}$ , bei 6  $\mu\text{M}$  fiel die Luciferaseaktivität auf  $68,79\% \pm 7,62\%$  ( $p < 0,02$ ), bei 7  $\mu\text{M}$  auf  $59,40\% \pm 10,91\%$  ( $p = 0,02$ ), bei 8  $\mu\text{M}$  auf  $57,57\% \pm 7,54\%$  ( $p = 0,01$ ), bei 9  $\mu\text{M}$  auf  $53,51\% \pm 7,92\%$  ( $p = 0,01$ ) und bei 10  $\mu\text{M}$  auf  $47,65 \pm 5,69\%$  ( $p < 0,01$ ).

### 3. Ergebnisse



**Abb. 13: Luciferase-Assay mit HepG2-p100CRP/luciferase: Transkriptionelle Aktivität des mit Interleukin 6 (IL-6) stimulierten Zellklons HepG2-p100CRP/luciferase in Abhängigkeit von verschiedenen Galiellalactonkonzentrationen nach 32 bzw. 48 h. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem Lösungsmittel für Galiellalacton Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt wurden. Dargestellt sind hier die Mittelwerte aus drei Versuchen in Relation zu mit IL-6 stimulierten Zellen mit entsprechenden Standardabweichungen. Signifikanzberechnungen wurden jeweils auf mit 50 ng/ml IL-6 stimulierte Zellen angewandt und sind folgendermaßen gekennzeichnet:**

\*:  $p < 0,05$ ; +:  $p \leq 0,02$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; ++:  $p = 0,001$

(Abkürzungen: HepG2: Hepatomzelllinie G2, CRP: C-reaktives Protein)

Nach 48 h betrug die Promoteraktivität für mit DMSO behandelte Zellen  $64,45\% \pm 5,84\%$  ( $p < 0,01$ ) des Ausgangswertes. Nach Behandlung mit Galiellalacton betrug sie bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$   $109,48\% \pm 15,94\%$  (ns), bei  $2 \mu\text{M}$   $107,09\% \pm 17,41\%$  (ns), bei  $3 \mu\text{M}$   $113,25\% \pm 21,02\%$  (ns), bei  $4 \mu\text{M}$   $112,47\% \pm 25,97\%$  (ns). Bei  $5 \mu\text{M}$  Galiellalacton sank sie auf  $89,18\% \pm 13,74\%$  (ns), bei  $6 \mu\text{M}$  auf  $86,39\% \pm 18,51\%$  (ns), bei  $7 \mu\text{M}$  auf  $76,83\% \pm 19,02\%$  (ns), bei  $8 \mu\text{M}$  auf  $78,90\% \pm 17,46\%$

### 3. Ergebnisse

(ns), bei 9  $\mu\text{M}$  auf  $75,52\% \pm 18,07\%$  (ns), bei 10  $\mu\text{M}$  auf  $77,50\% \pm 17,06\%$  (ns). Tendenziell war demnach auch nach 48 h eine Abnahme der Promoteraktivität zu beobachten, allerdings trat diese erst bei einer Galiellalactonkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  auf und war nicht signifikant. Alle Ergebnisse sind graphisch in Abb. 13 dargestellt.

#### 3.2.1.3 HepG2-p150CRP/luciferase

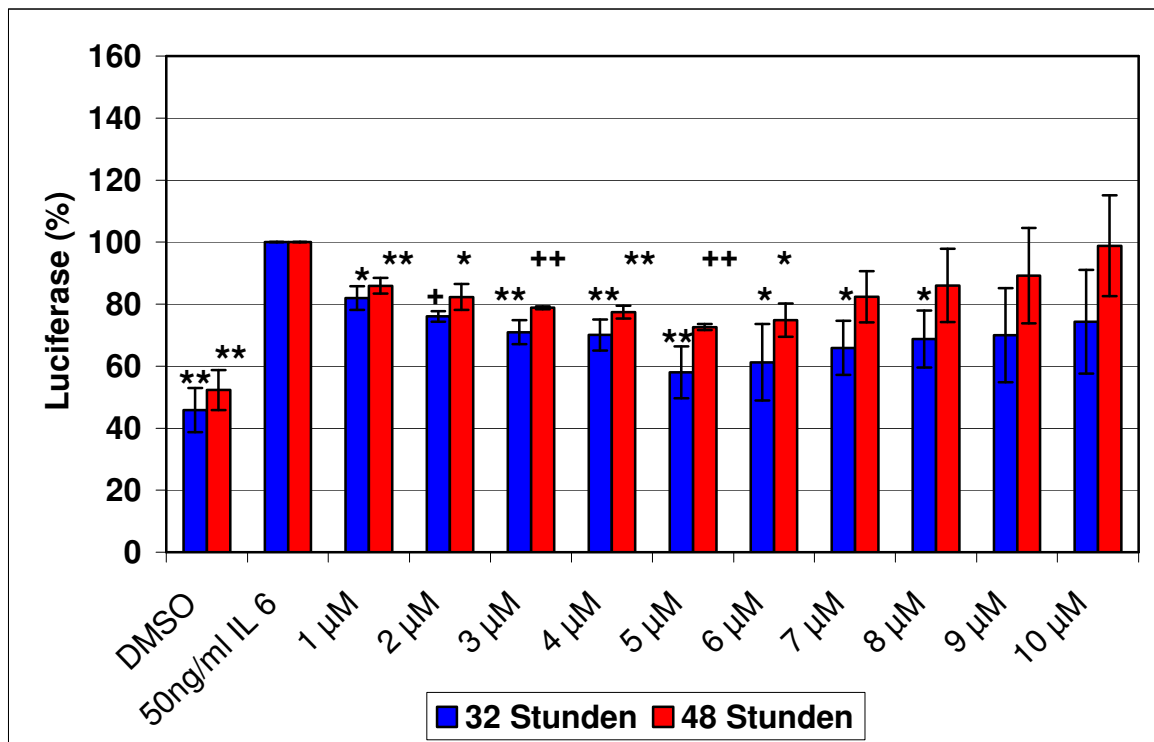


Abb. 14: Luciferase-Assay mit HepG2-p150CRP/luciferase: Transkriptionelle Aktivität des mit Interleukin 6 (IL-6) stimulierten Zellklons HepG2-p150CRP/luciferase in Abhängigkeit von verschiedenen Galiellalactonkonzentrationen nach 32 bzw. 48 h. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem Lösungsmittel für Galiellalacton Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen in Relation zu mit IL-6 stimulierten Zellen mit entsprechenden Standardabweichungen. Signifikanzberechnungen wurden jeweils auf mit 50 ng/ml IL-6 stimulierte Zellen angewandt und sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; +:  $p = 0,002$ ; ++:  $p < 0,001$  (Abkürzungen: HepG2: Hepatomzelllinie G2, CRP: C-reaktives Protein)

Bei HepG2-p150CRP/luciferase betrug die ermittelte Promoteraktivität nach 32 h für mit DMSO behandelte Zellen  $45,82\% \pm 7,12\%$  ( $p < 0,01$ ) was eine Verdoppelung nach Stimulation mit 50 ng/ml IL-6 bedeutete. Bei Messung der prozentualen Luciferaseaktivität 32 h nach Behandlung mit Galiellalacton fiel diese bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Galiellalacton auf  $81,99\% \pm 3,83\%$  ( $p < 0,05$ ) und sank bei 2  $\mu\text{M}$  auf  $76,04\% \pm 1,69\%$  ( $p = 0,002$ ), bei 3  $\mu\text{M}$  auf  $70,92 \pm 3,88\%$  ( $p < 0,01$ ), bei 4  $\mu\text{M}$  auf  $70,04\% \pm 5,00\%$  ( $p < 0,01$ ), bis auf  $58,00\% \pm 8,33\%$  ( $p = 0,01$ ) bei 5  $\mu\text{M}$ . Für eine Galiellalactonkonzentration von 6  $\mu\text{M}$  ergab sich ein wieder ansteigender Wert von  $61,25\% \pm 12,31\%$  ( $p < 0,05$ ), bei 7  $\mu\text{M}$  von  $65,88\% \pm 8,71\%$  ( $p < 0,05$ ) und bei 8  $\mu\text{M}$  von  $68,75\% \pm 9,19\%$  ( $p < 0,05$ ). Bei einer Konzentration von 9  $\mu\text{M}$  stieg die Luciferaseaktivität weiter auf  $69,99\% \pm 15,16\%$  (ns) und bei 10  $\mu\text{M}$  auf  $74,32\% \pm 16,74\%$  (ns), war allerdings nicht signifikant.

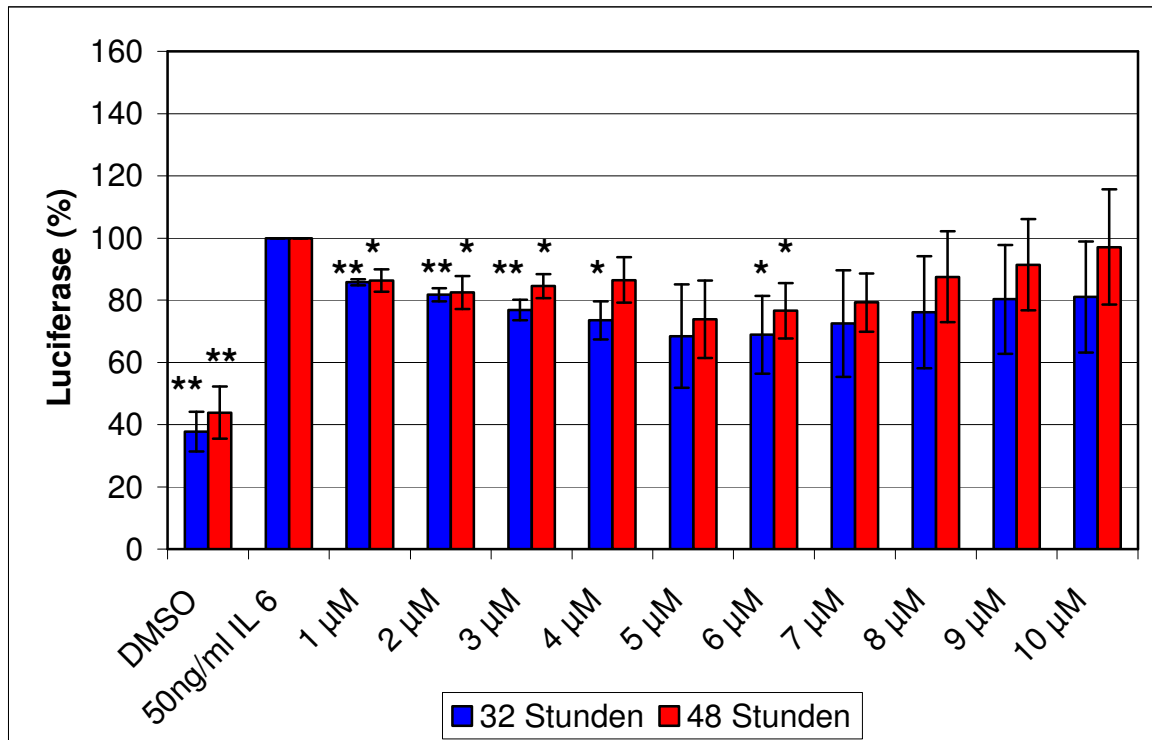
Nach 48 h Inkubationszeit wurde ein ähnliches Ergebnis festgestellt: Hier ergab sich für mit DMSO behandelte Zellen eine Promoteraktivität von  $52,30\% \pm 6,47\%$  ( $p < 0,01$ ), was ebenfalls in etwa einer Verdoppelung nach Stimulation mit 50 ng/ml IL-6 entspricht. Bei Behandlung des Zellklons mit Galiellalacton kam es auch hier bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Abnahme der Promoteraktivität auf  $85,92\% \pm 2,56\%$  ( $p = 0,01$ ), die im Verlauf weiter fiel: bei 2  $\mu\text{M}$  auf  $82,32\% \pm 4,20\%$  ( $p < 0,05$ ), bei 3  $\mu\text{M}$  auf  $78,82\% \pm 0,50\%$  ( $p < 0,001$ ), bei 4  $\mu\text{M}$  auf  $77,42\% \pm 2,11\%$  ( $p < 0,01$ ) und bei 5  $\mu\text{M}$  schließlich auf  $72,60\% \pm 1,01\%$  ( $p < 0,001$ ). Bei Zugabe von 6  $\mu\text{M}$  Galiellalacton kam es wieder zu einem Anstieg der Promoteraktivität auf  $74,80\% \pm 5,37\%$  ( $p < 0,05$ ), die bei 7  $\mu\text{M}$  auf  $82,39\% \pm 8,25\%$  (ns), bei 8  $\mu\text{M}$  auf  $86,03\% \pm 11,79\%$  (ns), bei 9  $\mu\text{M}$  auf  $89,19\% \pm 15,34\%$  (ns) und bei 10  $\mu\text{M}$  schließlich auf  $98,83\% \pm 16,28\%$  (ns) zunahm. Für die Konzentrationen 7, 8, 9 und 10  $\mu\text{M}$  waren keine Signifikanzen zu verzeichnen. Die Ergebnisse nach 32 bzw. 48 h sind in Abb. 14 graphisch zusammengefasst.

#### **3.2.1.4 HepG2-p250CRP/luciferase**

Die Versuche mit HepG2-p250CRP/luciferase 32 und nach 48 h nach Behandlung mit Galiellalacton lieferten ein ähnliches Ergebnis (Abb. 15) wie jene mit HepG2-

### 3. Ergebnisse

p150CRP/luciferase. Auch hier nahm die prozentuale Luciferaseaktivität zunächst ab und stieg bei steigenden Galiellalactonkonzentrationen wieder an.



**Abb. 15: Luciferase-Assay mit HepG2-p250CRP/luciferase: Transkriptionelle Aktivität des mit Interleukin 6 (IL-6) stimulierten Zellklons HepG2-p250CRP/luciferase in Abhängigkeit von verschiedenen Galiellalactonkonzentrationen nach 32 bzw. 48 h. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem Lösungsmittel für Galiellalacton Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen in Relation zu mit IL-6 stimulierten Zellen mit entsprechenden Standardabweichungen. Signifikanzberechnungen wurden jeweils auf mit 50 ng/ml IL-6 stimulierte Zellen angewandt und sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$**

(Abkürzungen: HepG2: Hepatomzelllinie G2, CRP: C-reaktives Protein)

Bei Stimulation von HepG2-p250CRP/luciferase mit 50 ng/ml IL-6 stieg die Luciferaseaktivität nach 32 h um das Dreifache, da die Promoteraktivität für mit DMSO behandelte Zellen  $37,75\% \pm 6,36\%$  ( $p < 0,01$ ) des Wertes von mit 50 ng/ml IL-6 stimulierten Zellen ausmachte. 32 h nach Behandlung mit Galiellalacton



### 3. Ergebnisse

---

sank die Promoteraktivität bei der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  signifikant auf  $85,79\% \pm 1,04\%$  ( $p < 0,01$ ), bei 2  $\mu\text{M}$  auf  $81,70\% \pm 2,09\%$  ( $p < 0,01$ ), bei 3  $\mu\text{M}$  auf  $76,85\% \pm 3,30\%$  ( $p < 0,01$ ), sowie bei 4  $\mu\text{M}$  auf  $73,48\% \pm 6,14$  ( $p < 0,05$ ). Sie erreichte bei 5  $\mu\text{M}$  mit  $68,42\% \pm 16,62\%$  (ns) ihren Tiefpunkt und stieg bei 6  $\mu\text{M}$  wieder auf  $68,86\% \pm 12,52\%$  ( $p = 0,05$ ), bei 7  $\mu\text{M}$  auf  $72,48\% \pm 17,21\%$  (ns), bei 8  $\mu\text{M}$  auf  $76,14\% \pm 18,06\%$  (ns), bei 9  $\mu\text{M}$  auf  $80,29\% \pm 17,52\%$  (ns) und bei 10  $\mu\text{M}$  schließlich auf  $81,07\% \pm 17,90\%$  (ns).

Für mit DMSO behandelte Zellen nach 48 h ergab sich eine Luciferaseaktivität von  $43,85\% \pm 8,41\%$  ( $p < 0,01$ ), was etwas mehr als eine Verdoppelung durch Stimulation mit 50 ng/ml IL-6 bedeutete. 48 h nach Behandlung mit Galiellalacton kam es bei einer Galiellalactonkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  zu einem Abfallen der Promoteraktivität auf  $86,33\% \pm 3,62\%$  ( $p < 0,05$ ), die sich bei Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  Galiellalacton auf  $82,50\% \pm 5,33\%$  ( $p < 0,05$ ), bei 3  $\mu\text{M}$  auf  $84,52\% \pm 3,94\%$  ( $p < 0,05$ ) und bei 4  $\mu\text{M}$  auf  $86,52\% \pm 7,37\%$  (ns) reduzierte. Der nicht signifikante Tiefpunkt wurde mit  $73,85\% \pm 12,43\%$  (ns) bei 5  $\mu\text{M}$  ermittelt, wobei es bei 6  $\mu\text{M}$  wieder zu einer Zunahme der Promoteraktivität auf  $76,58\% \pm 8,90\%$  ( $p < 0,05$ ) kam. Bei 7  $\mu\text{M}$  stieg sie weiter auf  $79,27\% \pm 9,41\%$  (ns), bei 8  $\mu\text{M}$  auf  $87,55\% \pm 14,65\%$  (ns), bei 9  $\mu\text{M}$  auf  $91,42\% \pm 14,67\%$  (ns) und bei 10  $\mu\text{M}$  auf  $97,10\% \pm 18,57\%$  (ns).

#### 3.2.1.5 Zusammenfassung der Promoteraktivität

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für HepG2-fl-p1000CRP/luciferase nach 32 und nach 48 h eine signifikante Abnahme der Promoteraktivität bei steigenden Galiellalactonkonzentrationen gezeigt werden konnte. Die ermittelte  $\text{IC}_{50}$  lag hierbei nach 32 h bei ca. 5 - 6  $\mu\text{M}$ . Auch die Promoteraktivität von HepG2-p100CRP/luciferase nach 32 h nahm mit steigenden Galiellalactonkonzentrationen ab. Die Promoteraktivität dieses Zellklons nach 48 h zeigte eine ähnliche Tendenz, wies allerdings keine Signifikanz auf.

Die Versuche mit HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase zeigten einen charakteristischen Kurvenverlauf mit Abnahme der Promoteraktivität ab einer Galiellalactonkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  bis zu einer

### 3. Ergebnisse

Galiellalactonkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  und anschließender Zunahme bei steigenden Konzentrationen bis 10  $\mu\text{M}$ .

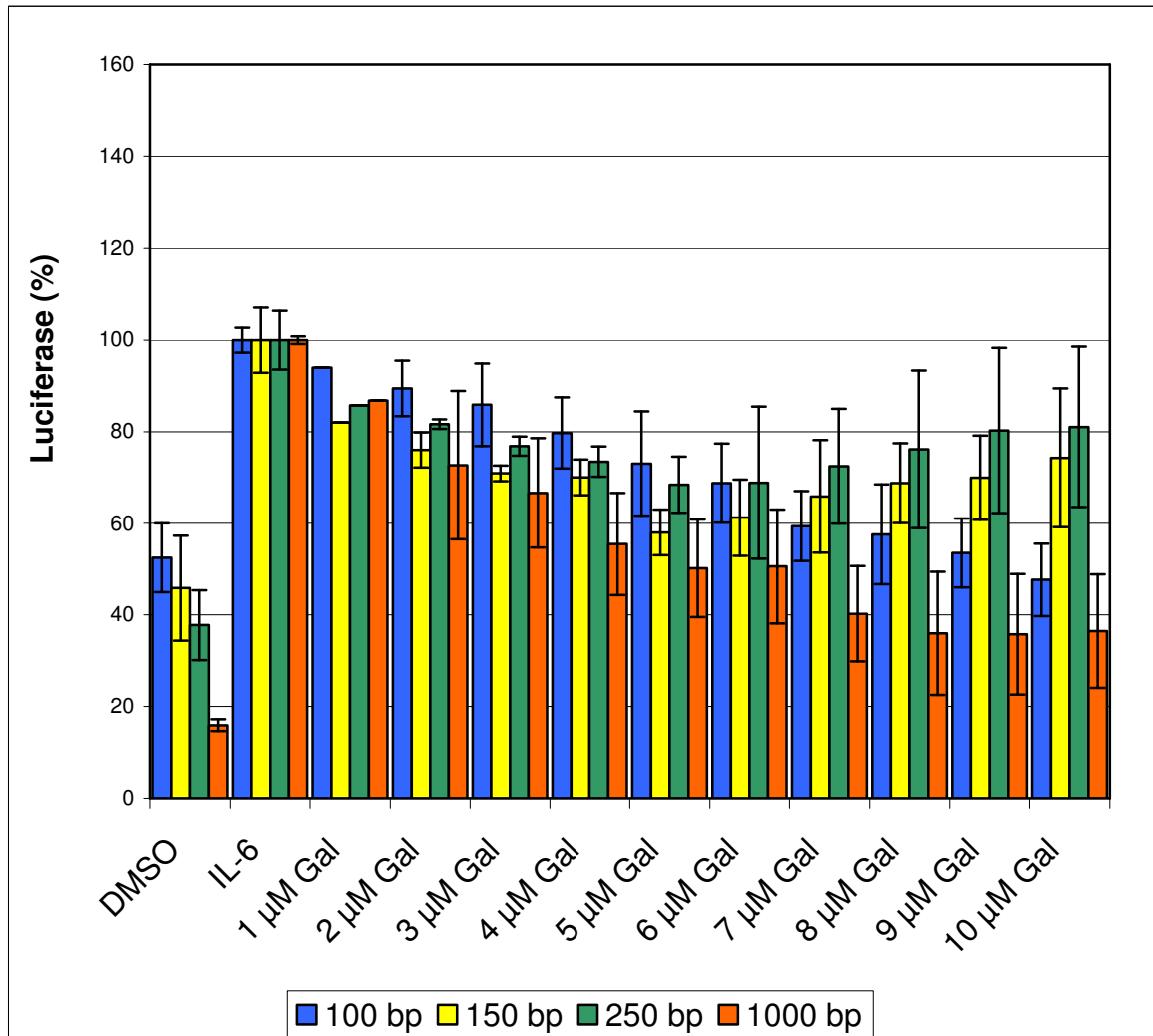


Abb. 16: Zusammenfassung Luciferase-Assay nach 32 h: Darstellung der transkriptionellen Aktivität der mit Interleukin 6 (IL-6) stimulierten Zellklone HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase in Abhängigkeit von verschiedenen Galiellalactonkonzentrationen nach 32 h. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem Lösungsmittel für Galiellalacton Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen in Relation zu mit IL-6 stimulierten Zellen mit entsprechenden Standardabweichungen.

(Abkürzungen: HepG2: Hepatomzelllinie G2, fl: full length, CRP: C-reaktives Protein)

### 3. Ergebnisse

Des Weiteren fiel auf, dass die Stimulation mit humanem IL-6 bei HepG2-fl-p1000CRP/luciferase im Vergleich zu den anderen Deletionskonstrukten weitaus höhere Effektivität besaß.

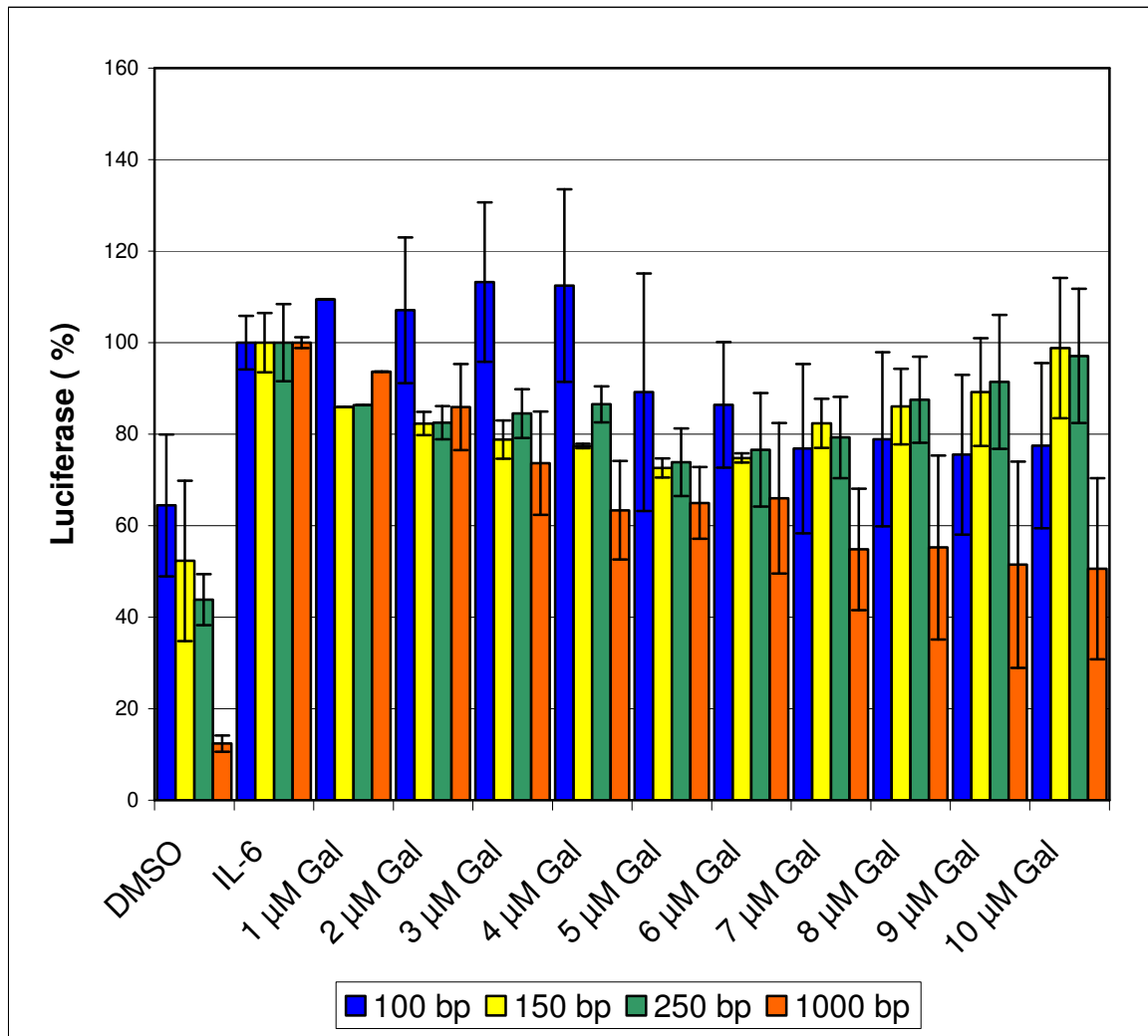


Abb. 17: Zusammenfassung Luciferase-Assay nach 48 h: Darstellung der transkriptionellen Aktivität der mit Interleukin 6 (IL-6) stimulierten Zellklone HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase in Abhängigkeit von verschiedenen Galiellalactonkonzentrationen nach 48 h. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem Lösungsmittel für Galiellalacton Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen in Relation zu mit IL-6 stimulierten Zellen mit entsprechenden Standardabweichungen.

(Abkürzungen: HepG2: Hepatomzelllinie G2, fl: full length, CRP: C-reaktives Protein)

Abb. 16 und Abb. 17 fassen die erfolgten Versuche zusammen und geben einen Überblick über die Promoteraktivität von HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase nach Behandlung mit Galiellalactonkonzentrationen von 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10  $\mu\text{M}$  nach 32 h (Abb. 16) und nach 48 h (Abb. 17).

#### **3.2.2 Vitalität von HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase nach Behandlung mit Galiellalacton**

Um toxische Effekte von Galiellalacton aufzuzeigen, die auch zu einer Verfälschung der Ergebnisse beitragen könnten, wurden für HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase die unter 2.2.6 beschriebenen Vitalitätstests durchgeführt. Die Vitalität der Zellen bei Galiellalactonkonzentrationen von 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10  $\mu\text{M}$  wurde in Relation zu unbehandelten, d.h. ausschließlich mit Hepatozytenmedium behandelten Zellen (NT) angegeben, die als Negativkontrolle dienten. Auch die erfolgten Signifikanzberechnungen wurden auf unbehandelte Zellen angewandt. Aus Gründen der Übersicht sollen im Folgenden nur signifikante Werte beschrieben werden, eine Darstellung aller ermittelten Werte erfolgt graphisch (Abb. 18 – 21).

Bei HepG2-fl-p1000CRP/luciferase (Abb. 18) wurde nach 32 h eine signifikante Abnahme der Vitalität auf  $91,43\% \pm 2,67\%$  ( $p < 0,05$ ) für eine Konzentration von 6  $\mu\text{M}$  Galiellalacton berechnet, außerdem für mit DMSO behandelte Zellen auf  $95,99\% \pm 0,77\%$  ( $p = 0,01$ ). Nach 48 h trat eine signifikante Vitalitätsabnahme auf  $90,80\% \pm 3,32\%$  ( $p < 0,05$ ) bei einer Galiellalactonkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  auf. Alle anderen Werte für diesen Zellklon nach 32 und 48 h waren nicht signifikant.

Bei HepG2-p100CRP/luciferase (Abb. 19) sank nach 32 h die Vitalität von mit 50 ng/ml IL-6 stimulierten Zellen signifikant auf  $94,42\% \pm 2,12\%$  ( $p < 0,05$ ), von Zellen nach Behandlung mit 9  $\mu\text{M}$  Galiellalacton auf  $90,00\% \pm 2,66\%$  ( $p < 0,05$ ) und 10  $\mu\text{M}$  Galiellalacton auf  $87,85\% \pm 1,30\%$  ( $p < 0,01$ ). Alle weiteren Werte nach 32 sowie nach 48 h waren nicht signifikant.

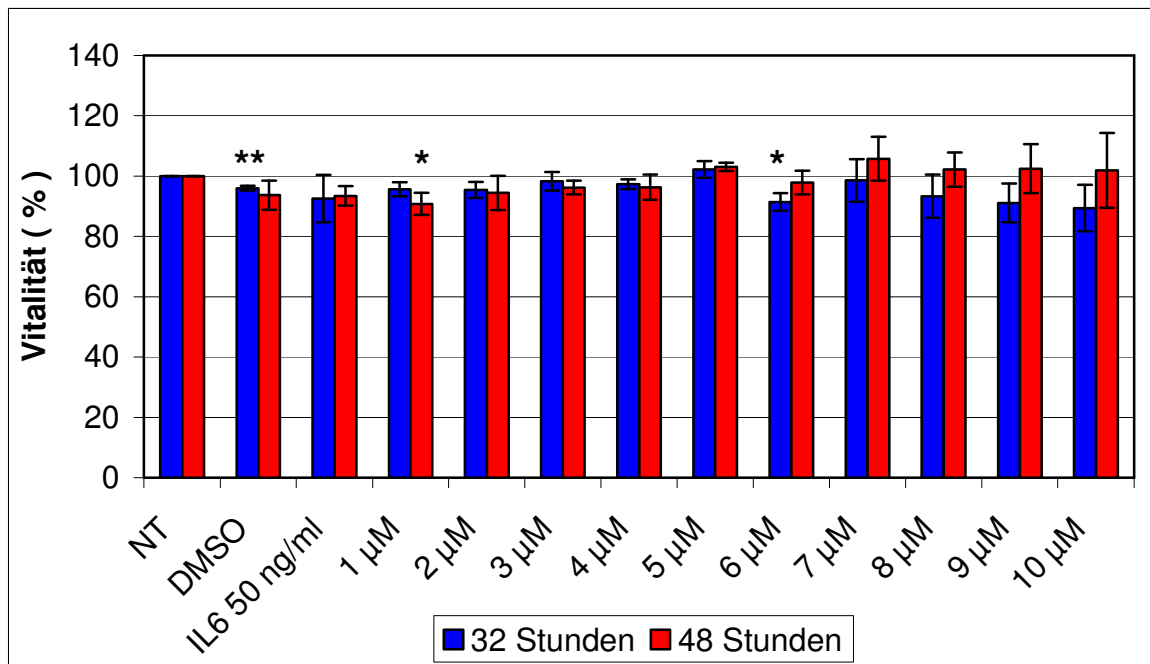


Abb. 18: Vitalität von HepG2-fl-p1000CRP/luciferase nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Galliclacton in Relation zu unbehandelten Zellen (NT) nach 32 h bzw. 48 h. Aufgeführt sind außerdem noch ausschließlich mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen in Relation zu unbehandelten Zellen (NT) mit entsprechenden Standardabweichungen. Signifikanzberechnungen wurden jeweils auf unbehandelte Zellen angewandt und sind folgendermaßen gekennzeichnet:

\*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p = 0,01$

(Abkürzungen: HepG2: Hepatomzelllinie G2, fl: full length, CRP: C-reaktives Protein)

Bei HepG2-p150CRP/luciferase (Abb. 20) konnten signifikante Werte für mit DMSO behandelte Zellen nach 32 h mit Absinken der Vitalität auf  $87,31\% \pm 2,70\%$  ( $p < 0,05$ ) und nach 48 h auf  $88,13\% \pm 4,56\%$  ( $p < 0,05$ ) ermittelt werden. Für alle verwendeten Galliclactonkonzentrationen nach 32 und nach 48 h ergab sich keine Signifikanz.

### 3. Ergebnisse

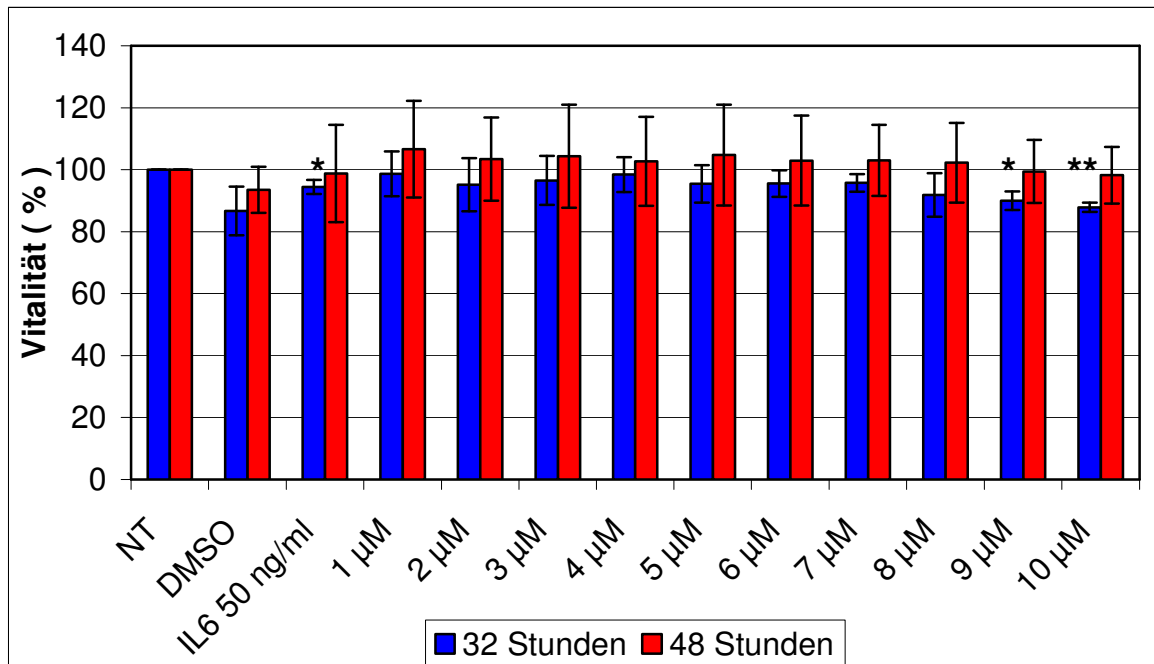


Abb. 19: Vitalität von HepG2-p100CRP/luciferase nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Galiellalacton in Relation zu unbehandelten Zellen (NT) nach 32 h bzw. 48 h. Aufgeführt sind außerdem noch ausschließlich mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen in Relation zu unbehandelten Zellen (NT) mit entsprechenden Standardabweichungen. Signifikanzberechnungen wurden jeweils auf unbehandelte Zellen angewandt und sind folgendermaßen gekennzeichnet:

\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$

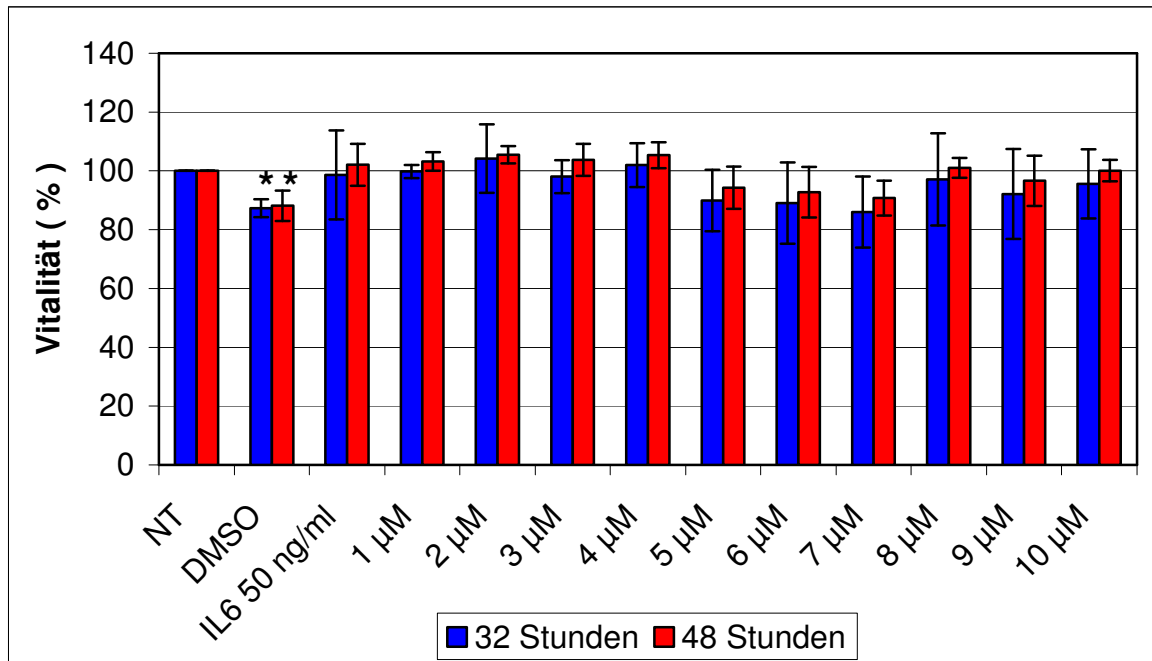
(Abkürzungen: HepG2: Hepatomzelllinie G2, CRP: C-reaktives Protein)

Für HepG2-p250CRP/luciferase (Abb. 21) wurde ein signifikantes Abfallen der Vitalität nach 32 h für mit DMSO behandelte Zellen auf  $91,29\% \pm 1,19\%$  ( $p < 0,01$ ) und nach 48 h für Zellen nach Behandlung mit Galiellalacton bei einer Konzentration von  $7 \mu\text{M}$  auf  $96,55\% \pm 0,89\%$  ( $p < 0,05$ ), von  $8 \mu\text{M}$  auf  $94,37\% \pm 1,14\%$  ( $p = 0,01$ ), von  $9 \mu\text{M}$  auf  $92,52\% \pm 1,00\%$  ( $p < 0,01$ ) und von  $10 \mu\text{M}$  auf  $89,80\% \pm 2,96\%$  ( $p < 0,05$ ) beobachtet. Alle anderen Werte nach 32 und nach 48 h waren nicht signifikant.

Die Abbildungen 18 – 21 geben einen Überblick über die Vitalität von HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase

### 3. Ergebnisse

und HepG2-p250CRP/luciferase nach Behandlung mit Galiellalacton nach 32 bzw. 48 h.



**Abb. 20: Vitalität von HepG2-p150CRP/luciferase nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Galiellalacton in Relation zu unbehandelten Zellen (NT) nach 32 h bzw. 48 h. Aufgeführt sind außerdem noch ausschließlich mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen in Relation zu unbehandelten Zellen (NT) mit entsprechenden Standardabweichungen. Signifikanzberechnungen wurden jeweils auf unbehandelte Zellen angewandt und sind mit \* ( $p < 0,05$ ) gekennzeichnet. (Abkürzungen: HepG2: Hepatomzelllinie G2, CRP: C-reaktives Protein)**

### 3. Ergebnisse

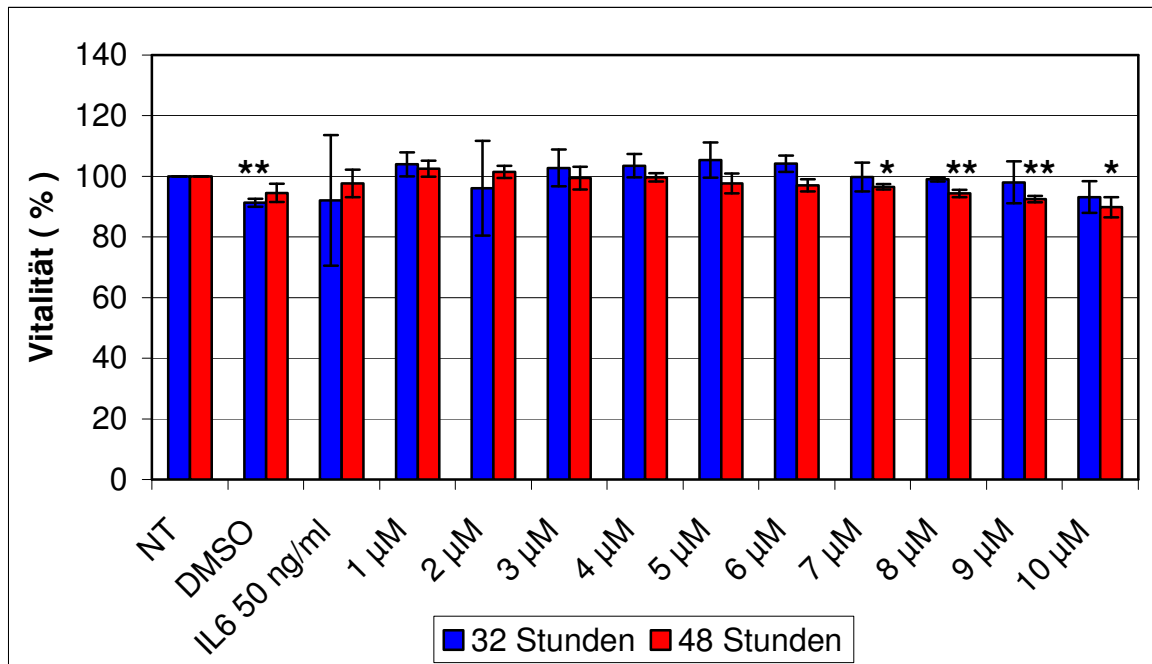


Abb. 21: Vitalität von HepG2-p250CRP/luciferase nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Galiellalacton in Relation zu unbehandelten Zellen (NT) nach 32 h bzw. 48 h. Aufgeführt sind außerdem noch ausschließlich mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen in Relation zu unbehandelten Zellen (NT) mit entsprechenden Standardabweichungen. Signifikanzberechnungen wurden jeweils auf unbehandelte Zellen angewandt und sind folgendermaßen gekennzeichnet:

\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$

(Abkürzungen: HepG2: Hepatomzelllinie G2, CRP: C-reaktives Protein)



### 4. Diskussion

#### ***4.1 Wahl eines entsprechenden Tier- und Zellkulturmodells***

Für die durchgeführten Versuche war die Frage nach einem geeigneten Modell zur Untersuchung der CRP-Synthese in vitro eine ganz entscheidende. Zum einen wurde ein Modell zur Untersuchung des Einflusses von Galactose auf CRP-Werte benötigt, welches die Situation im Menschen so gut wie möglich imitiert, zum anderen wurde ein zweites für die anschließende Analyse des Wirkmechanismus gesucht.

Im Zuge der Arbeit konnten frisch isolierte primäre Kaninchenhepatozyten, die mit humanem IL-6 stimuliert wurden, als Tiermodell für Untersuchungen der in vitro CRP-Synthese etabliert werden. Verschiedene Überlegungen ließen den Gebrauch von Kaninchenhepatozyten schon im Vorfeld der Versuche sinnvoll erscheinen: In bereits erfolgten Untersuchungen hatte sich die Verwendung der Maus als Versuchstier bezüglich in vivo Untersuchungen zur CRP-Funktion als ungeeignet erwiesen, da CRP in dieser nicht als Akute-Phase-Protein fungiert. Bei dem Versuch dieses Problem mit der Züchtung transgener Mäuse, die humanes CRP überexprimieren zu beseitigen, war es zu widersprüchlichen Untersuchungsergebnissen gekommen, was wohl unter anderem auch daran lag, dass humanes CRP in der Maus ein Antigen darstellt (Torzewski 2005, Kovacs et al. 2007, Trion et al. 2005, Danenberg et al. 2003). Komplizierter wurde die Lage noch da diese Mäuse mit ApoE-defizienten Mäusen gekreuzt wurden, die nicht über ein funktionsfähiges Komplementsystem verfügten (Reifenberg et al. 2005). Das Kaninchenmodell schien dem Mausmodell überlegen, da es dem Menschen bezüglich Akute-Phase-Reaktion und Atherogenese viel ähnlicher ist: So konnten in Versuchen mit Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) Kaninchen signifikant erhöhte CRP-Plasmaspiegel für hypercholesterämische Kaninchen gezeigt werden, die auch mit dem Ausmaß der Atherosklerose in den Tieren korrelierten. Des Weiteren läuft die Produktion von CRP im Kaninchen nicht nur physiologisch ab, das von Kaninchen produzierte CRP weist auch eine 70%-ige Übereinstimmung mit dem menschlichen auf (Sun et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte CRP mit Hilfe des Western Blots in Überständen von

Kaninchenhepatozyten nachgewiesen werden, was eine wichtige Grundlage für die nachfolgenden Versuche mit Galiellalacton darstellte. Die im Rahmen der Arbeit gemachte Beobachtung, dass humanes IL-6 die Freisetzung von Kaninchen-CRP stimuliert, legt die Vermutung nahe, dass sowohl die Regulation der Akute-Phase-Reaktion als auch die Sequenz des IL-6-Rezeptors bei Mensch und Kaninchen ähnlich sind.

Aus den aufgeführten Gründen geht hervor, dass das Kaninchenmodell humanen Gegebenheiten sehr nahe kommt, weshalb es für die Versuche zum Einfluss von Galiellalacton auf CRP-Werte geeignet schien. Diese bereits im Vorfeld angestellte Vermutung konnte durch den qualitativen CRP-Nachweis im Western Blot und die erfolgreiche Stimulation der Kaninchenhepatozyten mit humanem IL-6 bestätigt werden. Mit frisch isolierten Kaninchenhepatozyten gelang es daher ein Tiermodell zu etablieren, das für Versuche zur IL-6-vermittelten CRP-Synthese *in vitro* geeignet ist.

Für die genauere Analyse des Wirkmechanismus von Galiellalacton wurde mit transfizierten HepG2-Zellen, die mit dem vollständigen CRP-Promoter bzw. Anteilen des CRP-Promoters und dem Gen der Luciferase stabil transfiziert waren, ein geeignetes Zellkulturmodell geschaffen. Die Zellen sind im Gegensatz zu primären humanen Hepatozyten variabel verfügbar, einfach zu kultivieren und bieten mit dem Reporter gen der Luciferase eine einfache Möglichkeit zur Versuchsauswertung (Ivashchenko et al. 2005). Die Länge der transfizierten Promotersequenzen wurde bewusst unter Berücksichtigung der einzelnen Bindungsstellen der an der CRP-Synthese beteiligten Transkriptionsfaktoren gewählt.

### ***4.2 Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen***

#### **4.2.1 Qualitativer CRP-Nachweis aus Überständen von PKH**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte CRP qualitativ aus den Überständen von unbehandelten und mit humanem IL-6 stimulierten PKH nachgewiesen werden. Der erfolgreiche Nachweis deckt sich mit Untersuchungen, die eine physiologische CRP-Synthese in Kaninchenhepatozyten beschreiben (Sun et al. 2005). Der

qualitative CRP-Nachweis galt als wichtige Voraussetzung für die nachfolgenden Versuche zur quantitativen CRP-Reduktion durch Galiellalacton an Kaninchenhepatozyten und erschien ebenfalls bei der Etablierung eines Tiermodells zur IL-6-vermittelten CRP-Synthese in vitro wichtig.

### **4.2.2 Galiellalacton als ein spezifischer und potenter Inhibitor der CRP-Synthese**

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Galiellalacton CRP-Werte in Überständen von primären Kaninchenhepatozyten reduziert. Die gleiche Wirkung konnte unsere Arbeitsgruppe auch für primäre humane Hepatozyten zeigen (Torzewski et al. Publikation in Vorbereitung). Die halbmaximale Hemmkonzentration  $IC_{50}$  lag hier bei ca. 5 – 6  $\mu$ M. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit einer kürzlich zur therapeutischen Verwendung von Galiellalacton bei Prostatakarzinomen veröffentlichten Studie, die eine  $IC_{50}$  von 5  $\mu$ M identifizieren konnte (Hellsten et al. 2008).

Galiellalacton erniedrigte nicht nur CRP-Spiegel in den Überständen von Kaninchenhepatozyten, sondern führte auch zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Hemmung der CRP-Promoteraktivität von HepG2-fl-p1000CRP/luciferase. Die halbmaximale Hemmkonzentration war mit der bei PKH ermittelten kongruent und lag auch hier nach 32 h bei ca. 5 - 6  $\mu$ M. Aus der im Experiment nachgewiesenen Aktivitätsminderung des CRP-Promoters lässt sich folgern, dass Galiellalacton nicht eine Freisetzungshemmung von CRP verursacht, sondern unmittelbar in die CRP-Synthese eingreift und hier als Inhibitor fungiert.

Ein wichtiger Signalweg der IL-6-vermittelten CRP-Synthese läuft über die JAK/STAT- Signalkaskade, wobei es durch Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor zur Aktivierung einer Janus Kinase kommt, die durch Phosphorylierungsvorgänge eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 herbeiführt. Nach Dimerisierung von STAT3-Molekülen und Translokation dieser in den Zellkern erfolgt eine Bindung der STAT3-Dimere an den CRP-Promoter, an welchem diese eine Transkription herbeiführen (Zhang et al. 1996). In seinen Studien zur Wirkung von Galiellalacton auf IL-6-abhängige Signalkaskaden konnte Weidler zeigen, dass die Substanz weder Einfluss auf die Phosphorylierung noch auf die Dimerisierung von

STAT3-Monomeren hat. Sie verhindert vielmehr eine Bindung der STAT3-Dimere an ihre DNA-Bindungsstelle, so dass keine Interaktion mit den responsive elements der DNA erfolgen kann und es somit nicht zur Transkription der Zielgene kommt. Ursächlich nahm Weidler an, dass Galiellalacton eine kovalente Bindung mit einem Cystein-Rest in der DNA-bindenden Domäne von STAT3 eingeht, wodurch eine DNA-Bindung aus sterischen Gründen nicht mehr möglich ist (Weidler 2000). Unterstützt wird diese These mittlerweile durch Röntgenstrukturanalysen (Hellsten et al. 2008). Des Weiteren konnte Weidler auch eine Hemmung von NF- $\kappa$ B, AP-1 und NF-AT durch Galiellalacton feststellen, wobei hierzu weitaus höhere halbmaximale Hemmkonzentrationen  $IC_{50}$  nötig waren. Bei STAT1-vermittelten Signalwegen konnte ebenfalls ein nur mäßiger Einfluss von Galiellalacton gezeigt werden. Dies bestätigten auch Spezifitätskontrollen unserer Arbeitsgruppe mit primären humanen Hepatozyten, bei denen kein Effekt von Galiellalacton auf die Interferon (IFN)- $\beta$ -vermittelte Expression des Interferon-induced Protein with Tetratricopeptide Repeats 2 (IFIT-2), einer typischen STAT1-regulierten Signalkaskade, gezeigt werden konnten (Torzewski et al. Publikation in Vorbereitung). Aus all den beschriebenen Untersuchungsergebnissen lässt sich schließen, dass insgesamt von einer relativ potenten und spezifischen Wirkung von Galiellalacton auf den IL-6-vermittelten JAK/STAT-Signalweg ausgegangen werden kann. Mit Galiellalacton konnte daher ein viel versprechender, spezifischer und potenter Inhibitor der CRP-Synthese identifiziert werden.

### 4.2.3 Wirkung von IL-6 und Galiellalacton auf den CRP-Promoter

Die Versuche mit HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase wurden mit dem Ziel durchgeführt, genaueren Aufschluss über Angriffspunkt und Wirkmechanismus von Galiellalacton und den daran beteiligten CRP-Promotersequenzen zu gewinnen.

Zusätzlich soll an dieser Stelle die Stimulation der verschiedenen Zellkonstrukte mit humanem IL-6 diskutiert werden. Die Promoteraktivität nach Behandlung mit humanem IL-6 stieg bei HepG2-fl-p1000CRP/luciferase ca. auf den 6-fachen Wert

nach 32 h und den 8-fachen nach 48 h, was verglichen mit den anderen Deletionskonstrukten die stärkste Stimulation darstellte. Mit Abnahme der Länge der transfizierten CRP-Promotersequenzen war auch die mögliche Stimulation rückläufig und führte bei HepG2-p100CRP/luciferase nur noch zu einer Verdoppelung des Ausgangswertes. Diese Beobachtung lässt sich bei Kenntnis der Bindungsstellen der beteiligten Transkriptionsfaktoren auf dem CRP-Promoter erklären. Die durch IL-6 vermittelte Stimulation wird hauptsächlich durch die Transkriptionsfaktoren STAT3 mit der Bindungsstelle bei -108 bp und C/EBP $\beta$  mit synergistisch wirkenden Bindungsstellen bei -51 bis -54 bp und -215 bis -217 bp hervorgerufen (Zhang et al. 1996, Li u. Goldmann 1996). Bei den Versuchen kam es bereits bei HepG2-p100CRP/luciferase zu einer Stimulation, was sich mit der Literatur deckt, die eine Bindungsstelle für C/EBP $\beta$  auf dem Sequenzabschnitt der ersten 100 bp beschreibt. Bei Zunahme der CRP-Promotersequenzen haben längenabhängig noch mehr Transkriptionsfaktoren die Möglichkeit ihre zugehörige Bindungsstelle zu besetzen um somit eine Transkription hervorzurufen. Damit steigt die gemessene CRP-Promoteraktivität und ist somit bei HepG2-p100CRP/luciferase am geringsten und dem Zellklon, HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, dem Zellklon mit dem vollständigen CRP-Promoter am höchsten. Die Tatsache, dass die Antwort auf IL-6 bei HepG2-p250CRP/luciferase niedriger als bei HepG2-fl-p1000CRP/luciferase ausfällt, obwohl die Bindungsstellen der in der Literatur beschriebenen Transkriptionsfaktoren bereits auf den ersten 250 bp des CRP-Promoters liegen, führt zu der Annahme, dass wohl noch mehr Transkriptionsfaktoren oder andere Mediatoren eine Rolle zu spielen scheinen. Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass eine adäquate Stimulation mit humanem IL-6 den full length 1000 bp umfassenden CRP-Promoter benötigt und das Löschen bestimmter Promotersequenzen eine niedrigere Stimulation zur Folge hat.

Des Weiteren soll nun die Wirkung von Galacton auf dem CRP-Promoter diskutiert werden. Eine eindeutige konzentrationsabhängige Inhibition mit einer  $IC_{50}$  von ca. 5 – 6  $\mu$ M konnte hierbei nur für HepG2-fl-p1000CRP/luciferase nach 32 h gezeigt werden. Bei HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase zeigte sich ein glockenförmiger Kurvenverlauf mit

konzentrationsabhängiger Abnahme der Promoteraktivität bei 1, 2, 3, 4 und 5  $\mu\text{M}$  Galiellalacton, und einer wieder ansteigenden Promoteraktivität bei 6, 7, 8, 9 und 10  $\mu\text{M}$ . Um dieses Ergebnis interpretieren zu können, ist die Kenntnis der an der CRP-Synthese beteiligten Transkriptionsfaktoren nützlich. In der Literatur wird die Wirkung von Galiellalacton hauptsächlich durch eine Unterbrechung des IL-6-vermittelten STAT3-Signalwegs erklärt (Weidler et al. 2000). Die vorliegenden Versuchsergebnisse sprechen allerdings nicht für eine ausschließliche Interaktion von Galiellalacton mit STAT3, da HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase wie HepG2-fl-p1000CRP/luciferase auch eine Bindungsstelle für STAT3 bei -108 bp enthalten. Daher wäre eine mit HepG2-fl-p1000CRP/luciferase vergleichbare konzentrationsabhängige Inhibition mit ähnlichem Kurvenverlauf zu erwarten gewesen. Die Tatsache, dass dies nicht der Fall war, kann man sich mit der Interaktion von Galiellalacton mit weiteren hemmenden und aktivierenden Transkriptionsfaktoren, deren Bindungsstellen auf den ersten 250 bp des CRP-Promoters lokalisiert sind und modulierenden Einfluss auf die CRP-Synthese nehmen, erklären (Li et al. 1990, Li u. Goldman 1996). Vorstellbar wäre beispielsweise auch eine Interaktion mit NF- $\kappa$ B, der bei der CRP-Synthese eine komplizierte Rolle zu spielen scheint (Cha-Molstad et al. 2000, Agrawal et al. 2001, Agrawal et al. 2003 a, Voleti u. Agrawal 2005), da für diesen bereits eine Inhibition durch Galiellalacton gezeigt werden konnte (Weidler 2000). Um allerdings genauere Aussagen über Interaktionen von Galiellalacton mit anderen Transkriptionsfaktoren treffen zu können, sind weitere Versuche notwendig.

Aus den erfolgten Untersuchungen lässt sich letztendlich schließen, dass zu einer effektiven Galiellalacton-vermittelten Inhibition der gesamte CRP-Promoter nötig ist. Die Identifikation des genauen Wirkmechanismus von Galiellalacton gelang hierbei allerdings nicht.

### **4.2.4 Toxizität von Galiellalacton**

Da Galiellalacton als potentielles Medikament für den Einsatz in der kardiovaskulären Therapie getestet wurde, ist die Frage nach Toxizität eine ganz entscheidende. Bei HepG2-fl-p1000CRP/luciferase, HepG2-p100CRP/luciferase

und HepG2.p250CRP/luciferase zeigten sich bei der statistischen Auswertung zwar für einzelne Galiellalactonkonzentrationen signifikante Werte, allerdings traten diese relativ unsystematisch und auch nicht vorwiegend bei hohen Galiellalactonkonzentrationen auf, was bei toxischer Wirkung der Substanz zu erwarten gewesen wäre. Zudem fiel die Zellvitalität nie auf unter 85%. Bei HepG2-p150CRP/luciferase und PKH ergab sich überhaupt kein Anhalt auf Toxizität durch Galiellalacton. Aus den genannten Gründen ist daher nicht von einer toxischen Wirkung des Stoffes auf Hepatozyten auszugehen. Dies schließt auch aus, dass die festgestellte Galiellalacton-vermittelte Inhibition der CRP-Synthese auf toxischen Effekten basiert.

Auch für mit DMSO behandelte Zellen ergaben sich vereinzelt signifikante Werte. Da deren Auftreten jedoch ebenfalls sehr unsystematisch schien, die Zellvitalität nie unter 85% fiel und es bei PKH sogar zu einem signifikanten Anstieg der Zellvitalität unter DMSO nach 32 und 48 h kam, kann man nicht von einer toxischen Wirkung des Lösungsmittels und auch nicht von einer damit einhergehenden Beeinflussung der Versuchsergebnisse ausgehen.

### **4.3 Grenzen der Arbeit**

Bei den Versuchen mit Kaninchenhepatozyten kam es zu einer relativ hohen Standardabweichung, was auch Probleme bei der Signifikanzberechnung mit sich brachte. Einen Erklärungsansatz hierfür könnte die Tatsache darstellen, dass für jeden Versuch ein neues Versuchstier mit unterschiedlichen basalen CRP-Spiegeln verwendet wurde. Da CRP auch im Kaninchen als Akute-Phase-Protein fungiert (Sun et al. 2005), kann man von stark schwankenden CRP-Spiegeln der unterschiedlichen Versuchstiere ausgehen. Dies könnte beispielsweise bei Einbezug eines Versuchstieres mit akuter Infektion in die statistische Auswertung bei insgesamt nur drei Versuchen die hohe Standardabweichung erklären. Um diesen Fehler auszuschließen, wäre es sinnvoll gewesen, im Vorfeld, die CRP-Plasmaspiegel der Versuchstiere zu bestimmen und drei Versuchstiere mit ähnlichen basalen Spiegeln in die Auswertung mit einzubeziehen.

Des Weiteren gelang es im Rahmen der Arbeit nicht den genauen Wirkmechanismus von Galiellalacton zu entschlüsseln. Die Versuche mit

transfizierten HepG2-Zellen legen zwar die Vermutung nahe, dass vermutlich mehrere Transkriptionsfaktoren in den Wirkmechanismus involviert sind. Letztendlich war allerdings nur die konkrete Schlussfolgerung möglich, dass zu einer effektiven Galiellalacton-vermittelten Hemmung der full length 1000 bp umfassende CRP-Promoter nötig ist.

### **4.4 Ausblick**

Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Versuche könnten neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen. Mit Galiellalacton wurde eine Substanz identifiziert, die CRP-Synthese und Akute-Phase-Reaktion spezifisch auf transkriptioneller Ebene inhibiert, indem sie eine IL-6-vermittelte Stimulation dieser Reaktionen unterbricht. Da es Studien gibt, die CRP nicht nur als Risikomarker, sondern auch als Risikofaktor für Atherogenese und deren Folgeerkrankungen betrachten, könnte ein CRP-Syntheseinhibitor neue Möglichkeiten in der Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bieten. Jüngste Resultate, die einen spezifischen CRP-Syntheseinhibitor sinnvoll erscheinen lassen stammen aus der JUPITER-Studie (Justification für the Use of Statins in Primary Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin). In dieser groß angelegten, placebo-kontrollierten, randomisierten, klinischen Doppelblindstudie profitierten Patienten mit niedrigen LDL-Cholesterinspiegeln und gleichzeitig erhöhten CRP-Spiegeln von der täglichen Einnahme des Cholesterinsyntheseinhibitors Rosuvastatin, indem sie verglichen mit einer Placebogruppe ein signifikant niedrigeres kardiovaskuläres Risiko aufwiesen. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass eine Senkung von CRP-Plasmaspiegeln bei der Vorbeugung kardiovaskulärer Erkrankungen ebenso wichtig wie eine Senkung von LDL-Spiegeln ist (Mora u. Ridker 2006, Efthimiadis 2008). Jedoch werden noch einige Hürden auf dem Weg zur Entwicklung eines neuen und effektiven Medikaments überwunden werden müssen. An vorderster Stelle hierbei stehen in vivo Versuche an Kaninchen, die nicht nur Bioverfügbarkeit, Spezifität und Toxizität einschließen, sondern auch eine genauere Erforschung des Wirkmechanismus von Galiellalacton beinhalten sollten. Hierbei erscheint besonders wichtig, ob dabei eine signifikante Reduktion von CRP-Plasmaspiegeln durch Galiellalacton in vivo erzielt werden kann. Auch



eine damit verbundene Prävention von atherosklerotischen Läsionen muss erst noch nachgewiesen werden, da die Atherogenese ein multifaktorieller Prozess ist und weitere Faktoren und Signalwege eine Rolle spielen. So wird die CRP-Synthese auch über den IL-6-abhängigen Ras/Raf/MEK/MAPK-Signalweg vermittelt (Heinrich et al. 2003), für den bisher keine Interaktion mit Galiellalacton gezeigt werden konnte. Zudem wurde jüngst auch eine Stimulation der Atherogenese durch IL-17, die über eine p38MAPK und Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) 1 und 2 abhängige NF- $\kappa$ B und C/EBP $\beta$  Aktivierung vermittelt wird, beschrieben (Patel et al. 2007).

Die biochemische Modifikation von Galiellalacton könnte zur Herstellung einer noch effektiveren Substanz führen, deren Wirkung allerdings auch zuerst in Tierversuchen untersucht werden müsste, bevor sie zur Testung im Rahmen klinischer Studien freigegeben werden könnte.

Die Versuche mit Galiellalacton geben nicht nur Anlass zu der Hoffnung auf eine neue therapeutische Option im kardiovaskulären Bereich. Da eine über IL-6 und STAT3-vermittelte Signalkaskade auch bei der Pathogenese anderer entzündlicher Erkrankungen eine Rolle zu spielen scheint, könnte deren Blockade hilfreich sein, die Akute-Phase-Reaktion und damit auch die laufenden Entzündungsvorgänge abzumildern. Den gleichen Zweck erfüllen beispielsweise IL-6-Antikörper, die bereits heute in der rheumatologischen Therapie zur Anwendung kommen. Beschrieben ist auch eine Beteiligung des IL-6-STAT3-abhängigen Signalwegs bei der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (Atreya u. Neurath 2008, Carey et al. 2008).

Doch nicht nur bei entzündlichen Vorgängen, auch bei der Pathogenese bestimmter Tumoren scheint dieser Signalweg eine Rolle zu spielen. Daten hierfür gibt es für das kolorektale Karzinom (Atreya u. Neurath 2008) und das Magenkarzinom (Mejías-Luque et al. 2008). Galiellalacton könnte daher theoretisch nicht nur zu Prävention und Therapie entzündlicher Erkrankungen eingesetzt werden, sondern auch bei der Behandlung onkologischer Patienten. Kürzlich wurde bereits eine Studie veröffentlicht, die den Einsatz von Galiellalacton bei hormonrefraktären Prostatakarzinomen verspricht (Hellsten et al. 2008).

#### 4. Diskussion

---

Insgesamt lässt sich daher sagen, dass mit Galiellalacton eine sehr viel versprechende und vielseitig einsetzbare Substanz entdeckt wurde, deren Eigenschaften und tatsächlicher Nutzen sich allerdings noch in zahlreichen Versuchen und klinischen Studien unter Beweis wird stellen müssen.

Fazit: Mit Galiellalacton wurde im Rahmen der Arbeit ein potenter, spezifischer und nicht toxisch wirkender Hemmstoff der CRP-Synthese in Hepatozyten identifiziert. Des Weiteren konnten frisch isolierte primäre Kaninchenhepatozyten als Tiermodell zur Studie der in vitro CRP-Synthese etabliert werden, was in Zukunft die Möglichkeit bieten wird weitere Substanzen im Hinblick auf ihre Eigenschaft bezüglich einer CRP-Synthesehemmung zu identifizieren.

## 5. Zusammenfassung

Viele Untersuchungen sehen das C-reaktive Protein (CRP), einen Laborparameter der klinischen Routine für ablaufende Entzündungsvorgänge im Blut, als Risikomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen. Ob es sich hierbei auch um einen Risikofaktor, der ursächlich für die Atherogenese verantwortlich ist, handelt, wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Die Hemmung der vorwiegend in Hepatozyten stattfindenden CRP-Synthese, die mit Interleukin 6 (IL-6) stimuliert werden kann und hauptsächlich über die Transkriptionsfaktoren Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) und CCAAT-box/Enhancer Binding Protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) vermittelt wird, könnte deshalb eine aussichtsreiche Möglichkeit der kardiovaskulären Therapie darstellen. Von dem Pilzmetaboliten Galiellalacton ist bekannt, dass er die IL-6-abhängige Janus Kinase (JAK)/STAT-Signalkaskade inhibiert, indem er die DNA-Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors STAT3 blockiert.

Fragestellung der Arbeit war daher, ob CRP sich in Überständen von mit IL-6 stimulierten Kaninchenhepatozyten qualitativ nachweisen und durch den Pilzmetaboliten Galiellalacton quantitativ reduzieren lässt. Interessant erschien außerdem die Frage, ob es sich bei dieser Substanz um einen CRP-Synthesinhibitor handelt und welchem genauen Wirkmechanismus sie unterliegt.

Der qualitative CRP-Nachweis gelang im Western Blot mit Überständen von frisch isolierten primären Kaninchenhepatozyten (PKH). Versuche zur CRP-Synthesehemmung mit Galiellalacton erfolgten zum einen mit Überständen von PKH zum anderen mit transfizierten Zellen der Hepatomzelllinie G2 (HepG2-Zellen). Verwendet wurden hierbei HepG2-Zellen, die mit dem vollständigen „full length“ (fl) 1000 Basenpaare umfassenden CRP-Promoter (HepG2-fl-p1000CRP/luciferase) bzw. CRP-Promoterabschnitten der ersten 100, 150 und 250 Basenpaare (HepG2-p100CRP/luciferase, HepG2-p150CRP/luciferase und HepG2-p250CRP/luciferase) und dem Gen der Luciferase stabil transfiziert waren. Der quantitative CRP-Nachweis vor und nach Zugabe verschiedener Galiellalactonkonzentrationen erfolgte bei PKH mit Hilfe des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), bei den verschiedenen transfizierten HepG2-Zellkonstrukten mit Hilfe des Luciferase-Assays. Um eine toxische Wirkung von

Galiellalacton auszuschließen, wurden alle Zelllinien zu Vitalitätstests herangezogen.

Im Rahmen der Versuche konnten frisch isolierte, mit humanem IL-6 stimulierte PKH als Tiermodell für Untersuchungen der CRP-Synthese in vitro etabliert werden. Außerdem konnte Galiellalacton als spezifischer, potenter und nicht toxisch wirkender Inhibitor der CRP-Synthese in PKH und HepG2-fl-p1000CRP/luciferase mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration von 5 – 6  $\mu\text{M}$  identifiziert werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass für eine effektive Galiellalacton-induzierte CRP-Synthesehemmung der vollständige CRP-Promoter benötigt wird. Eine genaue Identifikation des Wirkmechanismus von Galiellalacton am CRP-Promoter blieb allerdings aus. Hierzu werden, wie auch bis zu einer möglichen Verwendung der Substanz in der kardiovaskulären Therapie weitere Versuche folgen müssen.

Schlussfolgerung: Galiellalacton erscheint bei der Entwicklung neuer transkriptioneller Hemmstoffe von Akute-Phase-Reaktion und CRP-Synthese ein viel versprechender Wirkstoff zu sein.



8. Atreya R, Neurath MF: Signaling molecules: the pathogenic role of the IL-6/STAT-3 trans signaling pathway in intestinal inflammation and in colonic cancer. *Current Drug Targets*, 9: 369-374 (2008)
9. Ballou SP, Lozanski G. Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine*, 4: 361–368 (1992).
10. Barreton GB, Kirkpatrick CJ, Bültmann BD: Gefäße. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg): *Pathologie*, 3. Auflage, Urban und Fischer, S. 484 (2004)
11. Benditt EP, Benditt JM: Evidence for the monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70: 1753-1756 (1973)
12. Berk BC, Weintraub WS, Wayne Alexander R: Elevation of C-reactive protein in “active” coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology*, 65: 168-172 (1990)
13. Berliner JA., Heinecke JW: The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 20: 707-727 (1996)
14. Bhakdi S, Dorweiler B, Kirchmann R, Torzewski J, Weise E, Trantum-Jensen J, Walev I, Wieland E: On the pathogenesis of atherosclerosis: Enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *The Journal of Experimental Medicine*, 182: 1959-1971 (1995)
15. Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW: The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II. *The Journal of Experimental Medicine*, 190: 585-590 (1999)

16. Bhargava A: A longitudinal analysis of the risk factors for diabetes and coronary heart disease in the Framingham Offspring Study. *Population Health Metrics* (2003)
17. Black S, Kushner I, Samols D: C-reactive Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 48487–48490 (2004)
18. Blake GJ, Ridker PM: Inflammatory biomarkers and cardiovascular risk prediction. *Journal of Internal Medicine*, 252: 283-294 (2002)
19. Brown MS., Goldstein JL.: Scavenging for receptors. *Nature*, 343: 508-509 (1990)
20. Calabro P, Willerson JT, Yeh ET: Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation*, 108: 1930-1932 (2003)
21. Carey R, Jurickova I, Ballard E, Bonkowski E, Han X, Xu H, Denson LA: Activation of an IL-6: STAT3-dependent transcriptome in pediatric-onset inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14: 446-457 (2008)
22. Cha-Molstad H, Agrawal A, Zhang D, Samols D, Kushner I: The rel family member p50 mediates cytokine-induced C-reactive protein expression by a novel mechanism. *The Journal of Immunology*, 165: 4592–4597 (2000)
23. 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)

## 6. Literaturverzeichnis

---

24. Danenberg HD, Grad E, Swaminathan RV, Chen Z, Seifert P, Szalai AJ, Lotan C, Simon DI, Edelman ER: Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice. *Circulation*, 108: 512-515 (2003)
25. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GDO, Pepys MB, Gudnason V: C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *New England Journal of Medicine*, 350: 1387-1397 (2004)
26. De Beer FC, Soutar AK, Baltz ML, Trayner IM, Feinstein A, Pepys MB: Low density lipoprotein and very low density lipoprotein are selectively bound by aggregated c-reactive protein. *The Journal of Experimental Medicine*, 156: 230-242 (1982)
27. Efthimiadis A: Rosuvastatin and cardiovascular disease: did the strongest statin hold the initial promises? *Angiology*, 59: 62S-4S (2008)
28. Falk E.: Pathogenesis of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 47: 7-12 (2006)
29. Geertinger P, Soerensen H: On the reduced atherogenic effects of cholesterol feeding on rabbits with congenital complement (C6) deficiency. *Artery*, 1: 177-184 (1977)
30. Goldstein J.L., Brown M.S.: Atherosclerosis: The low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism*, 26: 1257-1275 (1977)
31. Goldstein J.L., Brown M.S.: The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry*, 46: 897-930 (1977)



32. Goldstein JL, Ho YK, Bosu SK, Brown MS: Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76: 333-337 (1979)
33. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R: Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Current Drug Metabolism*, 4: 292-312 (2003)
34. Hansson GK: Immune and inflammatory mechanisms in the development of atherosclerosis. *British Heart Journal*, 69: 38–41 (1993)
35. Hattori Y, Matsumura M, Kasai K: Vascular smooth muscle cell activation by C-reactive protein. *Cardiovascular Research*, 58: 186–195 (2003)
36. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F: Principles of Interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical Journal*, 374: 1–20 (2003)
37. Hellsten R, Johansson M, Dahlman A, Dizayi N, Sterner O, Bjartell A: Galiellalactone is a novel therapeutic candidate against hormone-refractory prostate cancer expressing activated Stat3. *The Prostate*, 68: 269-280 (2008)
38. Ivashchenko Y, Kramer F, Schäfer 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. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 25: 186-192 (2005)
39. Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK: C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis? *Hypertension*, 44: 6-11 (2004)

40. Johansson M, Sterner O: Synthesis of (+)-Galiellalactone. Absolute configuration of Galiellalactone. *Organic Letters*, 3: 2843-2845 (2001)
41. Kompoti M, Kompoti M, Drimis S, Papadaki A, Kotsomytis K, Pouloupoulou C, Gianneli D, Voutsinas D: Serum C-reactive protein at admission predicts in-hospital mortality in medical patients. *European Journal of Internal Medicine*, 19: 261-265 (2008)
42. Koenig W, Sund M, Fröhlich M, Fischer H, Löwel H, Döring 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)
43. Köpcke B, Johansson M, Sterner O, Anke H: Biologically active secondary metabolites from the ascomycete A111-95. 1. Production, isolation and biological activities. *The Journal of Antibiotics*, 55: 36-40 (2002)
44. Kovacs A, Tornvall P, Nilsson R, Tegnér J, Hamsten A, Björkegren J: Human C-reactive protein slows atherosclerosis development in a mouse model with human-like hypercholesterolemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 13768-13773 (2007)
45. Kramer F, Torzewski J, Veit K, Hombach V, Dedio J, Ivashchenko Y: Interleukin-1 $\beta$  stimulates acute phase response by inducing an NF $\kappa$ B and C/EBP $\beta$ -dependent autocrine IL-6 loop. *Molecular Immunology*, 45: 2678-2689 (2008)

46. Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, Meilahn EN: Relation of c-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. *American Journal of Epidemiology*, 144: 537-547 (1996)
47. Li S-P, Goldman ND: Regulation of human c-reactive protein gene expression by two synergistic IL-6 responsive elements. *Biochemistry*, 35: 9060-9068 (1996)
48. Li S-P, Liu T-Y, Goldman ND: Cis-acting elements responsible for IL-6-inducible C-reactive protein gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 4136-4142 (1990)
49. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, Maseri A: The prognostic value of c-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *New England Journal of Medicine*, 331: 417-424 (1994)
50. Lloyd-Jones DM, Liu K, Tian L, Greenland P: Narrative review: Assessment of C-reactive protein in risk prediction for cardiovascular disease. *Annals of Internal Medicine*, 145: 35-42 (2006)
51. Lunardi C, Dolcino M, Peterlana D, Bason C, Navone R, Tamassia N, Tinazzi E, Beri R, Corrocher R, Puccetti A: Endothelial cells' activation and apoptosis induced by a subset of antibodies against human cytomegalovirus: relevance to the pathogenesis of atherosclerosis. *Plos one*, 2: e473 (2007)
52. Martin GM, Sprague CA: Clonal senescence and atherosclerosis. *Lancet*, 11: 1370-1371 (1972)

53. Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, Akira S: Transcription factors NF-IL6 and NF- $\kappa$ B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90: 10193-10197 (1993)
54. Mejías-Luque R, Peiró S, Vincent A, Van Seuningen I, de Bolós C: IL-6 induces MUC4 expression through gp130/STAT3 pathway in gastric cancer cell lines. *Biochimica et biophysica Acta*, 1783: 1728-1736 (2008)
55. Mora S, Ridker PM: Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER) – can C-reactive protein be used to target statin therapy in primary prevention? *American Journal of Cardiology*, 97: 33-41 (2006)
56. Morrow DA, Rifai N, Antman EM, Weiner DL, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E: C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TIMI 11A substudy Thrombolysis in Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 31: 1460-1465 (1998)
57. Moshage HJ, Roelofs HMJ, van Pelt JF, Hazenberg BPC, van Leeuwen MA, Limburq PC, Aarden LA, Yap SH: The effect of interleukin-1, interleukin-6 and its interrelationship on the synthesis of serum amyloid a and C-reactive protein in primary cultures of adult human hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 155: 112-117 (1988)
58. Niculescu F, Badea T, Rus H: Sublytic C5b-9 induces proliferation of human aortic smooth muscle cells: role of mitogen activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Atherosclerosis*, 142: 47-56 (1999)

59. Niculescu F, Hugo F, Rus HG, Vlaicu R, Bhakdi S: Quantitative evaluation of the terminal C5b-9 complement complex by ELISA in human atherosclerotic arteries. *Clinical Experimental Immunology*, 69: 477-483 (1987)
60. Nishikawa T, Hagihara K, Serada S, Isobe T, Matsumura A, Song S, Tanaka T, Kawase I, Naka T, Yoshizaki K: Transcriptional complex formation of c-Fos, STAT3, and hepatocyte NF-1 is essential for cytokine-driven C-reactive protein gene expression. *The Journal of Immunology*, 180: 3492–3501 (2008)
61. Oksjoki R, Kovanen PT, Meri S, Pentikainen MO: Function and regulation of the complement system in cardiovascular diseases. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*, 12: 4696-708 (2007)
62. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET: Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*, 102: 2165–2168 (2000)
63. Patel DN, King CA, Bailey SR, Holt JW, Venkatachalam K, Agrawal A, Valente AJ, Chandrasekar B: Interleukin-17 Stimulates C-reactive protein expression in hepatocytes and smooth muscle cells via p38 MAPK and ERK1/2-dependent NF- $\kappa$ B and C/EBP $\beta$  activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 27229–27238 (2007)
64. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC jr, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F: Markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*, 107: 499–511 (2003)

65. Pepys MB, Hirschfield GM: C-reactive protein: A critical update. *The Journal of Clinical Investigation*, 111: 1805–1812 (2003)
66. Rahaman S, Lennon D, Febbraio M, Podrez E, Hazen S, Silverstein R: A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metabolism*, 4: 211-21 (2006)
67. Ramji DP, Vitelli A, Tronche F, Cortese R, Ciliberto G: The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/NF-IL6 and C/EBP $\delta$ /NFIL6 $\beta$ , are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms. *Nucleic Acids Research*, 21: 289-294 (1993)
68. Reifenberg K, Lehr HA, Baskal D, Wiese E, Schaefer SC, Black S, Samols D, Torzewski M, Lackner KJ, Husmann M, Blettner M, Bhakdis S. Role of C-reactive protein in atherogenesis. Can the apolipoprotein E knockout mouse provide the answer? *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 25: 1641-1646 (2005)
69. Reynolds GD, Vance RP: C-reactive protein immunohistochemical localization in normal and atherosclerotic human aortas. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 111: 265-269 (1987)
70. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N: C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *New England Journal of Medicine*, 342: 836-843 (2000)
71. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR: Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *New England Journal of Medicine*, 347: 1557-1565 (2002)

72. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, Pfeffer MA, Braunwald E: C-reactive protein levels and outcome after statin therapy. *New England Journal of Medicine*, 352: 20-28 (2005)
73. Ross R, Glomset JA, Harker L.: Response to Injury and Atherogenesis. *American Journal of Pathology*, 68: 675 – 684 (1977)
74. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362: 801-809 (1993)
75. Ross R: Cell biology of atherosclerosis. *Annual Review of Physiology*, 57: 791-804 (1995)
76. Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*, 340: 115-126 (1999)
77. Sabouret P, Cacoub P, Dallongeville J, Krempf M, Mas JL, Pinel JF, Priollet P, Steg G, Taminou D, Montalescot G: International prospective observational registry in patients at risk of atherothrombotic events. Results for the French arm at baseline and one year. *Archives of Cardiovascular Diseases*, 101: 81-88 (2008)
78. Saikku P: Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor in acute myocardial infarction. *European Heart Journal*, 14: 62-65 (1993)
79. Schmiedt W, Kinscherf R, Deigner HP, Kamenic H, Nauen O, Kilo J, Oelert H, Metz J, Bhakdi S: Complement C6-deficiency protects against diet-induced atherosclerosis in rabbits. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 18: 1790-1795 (1998)

80. Sun H, Koike T, Ichikawa T, Hatakeyama K, Shiomi M, Zhang B, Kitajima S, Masatoshi Morimoto M, Watanabe T, Asada Y, Chen YE, Fan J: C-reactive protein in atherosclerotic lesions its origin and pathophysiological significance. *American Journal of Pathology*, 167: 1139-1148 (2005)
81. Tillet WS, Francis T: Serological reactons in pneumonia with a nonprotein somatic fraction of pneumococcus. *The Journal of Experimental Medicine*, 52: 561-571 (1930)
82. Toniatti C, Demartis A, Monaci P, Nicosia A, Gennaro Ciliberto G: Synergistic trans-activation of the human C-reactive protein promoter by transcription factor HNF-1 binding at two distinct sites. *The EMBO Journal*, 9: 4467-4475 (1990)
83. Torzewski J, Oldroyd R, Lachmann P, Fitzsimmons C, Proudfoot D, Bowyer D: Complement-Induced Release of Monocyte Chemotactic Protein-1 From Human Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 16: 673-677 (1996)
84. Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Fröhlich 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. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 18: 1386-1392 (1998)
85. Torzewski J: C-reactive protein and atherogenesis. New insights from established animal models. *American Journal of Pathology*, 167: 923-925 (2005)
86. Torzewski J, Kamenz J, Klis G, Hombach V, Ivashchenko Y: Galiellalacton inhibits C-reactive protein synthesis in hepatocytes. (Publikation in Vorbereitung)



87. Torzewski M, Klouche M, Hock J, Meßner M, Dorweiler B, Torzewski J, Gabbert HE, Bhakdi S: Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 18: 369-378 (1998)
88. Torzewski M, Reifenberg K, Cheng F, Wiese E, Küpper I, Crain J, Lackner KJ, Bhakdi S: No effect of C-reactive protein on early atherosclerosis in LDLR<sup>-/-</sup> / human C-reactive protein transgenic mice. *Thrombosis and Haemostasis*, 99: 196-201 (2008)
89. Trion A, de Maat MP, Jukema JW, van der Laarse A, Maas MC, Offermann EH, Havekes LM, Szalai AJ, Princen HM, Emeis JJ: No effect of C-reactive protein on early atherosclerosis development in apolipoprotein E<sup>3</sup>-Leiden/Human C-reactive protein transgenic mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 25: 1635-1640 (2005)
90. Tron K, Manolov DE, Röcker C, Kächele M, Torzewski J, Nienhaus GU: C-reactive protein specifically binds to Fcγ receptor type I on a macrophage-like cell line. *European Journal of Immunology*, 38: 1414-1422 (2008)
91. Vlaicu R, Rus HG, Niculescu F, Cristea A: Quantitative determinations of immunoglobulins and complement components in human aortic atherosclerotic wall. *Médecine Interne*, 23: 29-35 (1985)
92. Volanakis JE: Complement activation by C-reactive protein complexes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 389: 235-250 (1982)

93. Voleti B, Agrawal A: Regulation of basal and induced expression of C-reactive protein through an overlapping element for OCT-1 and NF $\kappa$ B on the proximal promoter. *The Journal of Immunology*, 175: 3386–3390 (2005)
94. Weidler M: Inhibitoren der Acute Phase Response aus Pilzen. Biologische Dissertation, Universität Kaiserslautern (2000)
95. Weidler M, Rether J, Timm A, Erkel G: Inhibition of interleukin-6 signaling by galactinolactone. *FEBS Letters*, 484: 1-6 (2000)
96. Williams SC, Baer M, Dillner AJ, Johnson PJ: CRP2 (C/EBP $\beta$ ) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *The EMBO Journal*, 14: 3170-3183 (1995)
97. Wolbink GJ, Brouwer MC, Buysmann S, ten Berge IJ, Hack CE: CRP-mediated activation of complement in vivo: assessment by measuring circulating complement-C-reactive protein complexes. *Journal of Immunology*, 157: 473-479 (1996)
98. Yasojima K, Schab C, McGeer EG, McGeer PL: Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *American Journal of Pathology*, 158: 1039-1051 (2001)
99. Zhang D, Jiang SL, Rzewnicki D, Samols D, Kushner I: The effect of interleukin-1 on C-reactive protein expression in Hep3B cells is exerted at the transcriptional level. *The Biochemical Journal*, 310: S.143-148 (1995)
100. Zhang D, Sun M, Samols D, Kushner I: STAT3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6. *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 9503–9509 (1996)

101. Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J: C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation*,103: 1194-1197 (2001)

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. V. Hombach für die Ermöglichung meiner Doktorarbeit bedanken, für die Bereitstellung der Laborräume und die finanziellen Mittel.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. M. phil. Jan Torzewski für die sehr gute Betreuung bedanken. Seine Unterstützung, sein Ideenreichtum, die regelmäßigen Besprechungen und seine Fähigkeit die Dinge auf den Punkt bringen trugen sehr zum zügigen Gelingen der Arbeit bei. Danken möchte ich ihm außerdem für die Bereitstellung des Themas, der Räumlichkeiten und Materialien.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Arbeitsgruppe Hicran Schuler, Regine Baur und Heidi Ruhland. Ich danke euch sehr für eure Geduld beim Einarbeiten in die Methodik, für das Beantworten unzähliger Fragen, für die ständige fachkundige Unterstützung bei den Versuchen und der Auswertung.

Insbesondere Regine und Heidi möchte ich für die zügige Korrektur des Manuskripts danken, und dass ihr immer ein offenes Ohr für all meine Fragen und Belange hattet. Ich hätte mir keine bessere Betreuung wünschen können!

Außerdem möchte ich mich bei allen Labormitarbeitern und Doktoranden für die sehr gute Atmosphäre im Labor bedanken.

Des Weiteren möchte ich allen Freunden danken, die mich motiviert und mit Tipps und Anmerkungen bei der Doktorarbeit unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, dass sie mich immer unterstützt und mir mein Studium ermöglicht haben. Ohne euch wäre ich nie so weit gekommen. Danke dafür!