

**Gewebeprotective und antiinflammatorische
Wirkung von humanem Choriogonadotropin in
Mausmodellen mit autoimmunem Leberschaden**

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Caroline Steinmetz
geb. am 15.12.1978 in Frankfurt am Main

Mainz, 2012

Meinen Eltern
und meinem Mann

Zusammenfassung

Während der Schwangerschaft kommt es häufig zu einer spontanen Verbesserung von klinischen Symptomen der autoimmunen Hepatitis und anderen Th1-vermittelten Autoimmunerkrankungen. Die Gründe hierfür sind bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Eines der wichtigsten Hormone in der Schwangerschaft ist das humane Choriogonadotropin (hCG), welches schon in der frühen Schwangerschaft eine entscheidende Rolle spielt. Es sorgt für die Stimulation des Corpus luteums, wodurch es zur Ausschüttung von Progesteron kommt und somit die Einnistung der Blastozyste gewährleistet und die Abstoßung des Embryos verhindert wird.

In dieser Arbeit wurden Effekt und Signalweg von hCG in primären murinen und humanen Hepatozyten sowie in Mausmodellen mit T-Zell-abhängigem Leberschaden untersucht. hCG führte sowohl bei akuten als auch bei chronischen Leberschäden zu einer drastischen Senkung der Aspartat-Aminotransferase, einem Indikator für Lebererkrankungen. Die Histologie der Leber hCG-behandelter Tiere wies außerdem signifikant weniger apoptotische Zellen und eine deutliche Reduktion infiltrierender CD4⁺ T-Zellen auf.

Die Analyse des hCG-Signalweges zeigte, dass hCG die Langlebigkeitsproteine Foxo3a und Sirt1 reguliert. Die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges durch hCG führte zu einem Transport des Transkriptionsfaktors Foxo3a aus dem Zellkern, wodurch die proapoptotischen Zielgene Bim und Puma nicht mehr transkribiert werden können. Eine zusätzliche Hemmung von Foxo3a erfolgte durch die Aktivierung der Deacetylase Sirt1, indem diese phosphoryliert wird und in den Zellkern transloziert.

In weiteren Untersuchungen wurde der immunsuppressive Effekt von hCG näher betrachtet. Dabei stellte sich heraus, dass hCG effektiv die proteolytische Aktivität der Caspase-3 in Hepatozyten hemmt, wodurch die Ausschüttung der biologisch aktiven Form von Interleukin-16, einem chemotaktischen Faktor für CD4⁺ Zellen, herabgesetzt wird. Dadurch wird die Leber erfolgreich vor der Infiltration durch autoaggressive CD4⁺ Zellen geschützt. IL-16 spielt bei vielen inflammatorischen Krankheiten eine Rolle, was auch in dieser Arbeit durch den Nachweis hoher IL-16-Konzentrationen in Seren von Patienten mit autoimmuner Hepatitis bestätigt werden konnte.

Die in dieser Studie beschriebene Wirkung von hCG und die Tatsache, dass hCG ein bereits bewährtes und auf Nebenwirkungen getestetes Medikament bei Infertilität ist,

macht es zu einem idealen Kandidaten für immunsuppressive Therapieansätze bei akuten und chronisch entzündlichen Lebererkrankungen.

Inhalt

1	EINLEITUNG	10
1.1	Autoimmunität und Schwangerschaft.....	10
1.2	Autoimmunhepatitis	11
1.3	Interleukin 16.....	13
1.4	Humanes Choriogonadotropin	14
1.4.1	Struktur und Funktion von hCG.....	14
1.4.2	Die hCG-Signalwege	16
1.5	CD95-vermittelte Apoptose	18
1.5.1	Apoptose.....	18
1.5.2	Extrinsischer Signalweg und das CD95/CD95Ligand-System	19
1.5.3	Intrinsischer (mitochondrialer) Signalweg	22
1.5.4	Bcl-2 Proteine	23
1.5.5	CD95-vermittelte Apoptose in der Leber	25
1.6	Langlebigkeitsproteine Foxo3a und Sirt1	26
1.6.1	Der Transkriptionsfaktor Foxo3a.....	26
1.6.2	Die NAD-abhängige Deacetylase Sirtuin1 (Sirt1).....	29
1.7	Mausmodelle für autoimmune Hepatitis	32
1.7.1	Akute Hepatitis induziert durch Concanavalin A	32
1.7.2	Chronische Hepatitis induziert durch lacBSA.....	35
1.8	Fragestellung und Zielsetzung	36
2	MATERIAL UND METHODEN.....	38
2.1	Material	38
2.1.1	Antikörper	38
2.1.2	Plasmide	39
2.1.3	Oligonukleotid-Primer	41
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien	42
2.1.5	Geräte und Verbrauchsmaterialien	44
2.1.6	Inhibitoren	45
2.1.7	Medien, Lösungen, Puffer.....	45
2.1.8	Kits.....	48
2.1.9	Versuchstiere	48
2.2	Methoden	49
2.2.1	Das ConA-Hepatitismodell.....	49
2.2.2	CD95-induzierter Leberschaden	49
2.2.3	Das lacBSA-Modell.....	49
2.2.4	Isolierung primärer humaner Hepatozyten	50
2.2.5	Isolierung primärer muriner Hepatozyten	50
2.2.6	Transfektion von primären Hepatozyten	51
2.2.7	Luziferase-Reporter-Assay	51

2.2.8	Apoptose- und Zellvitalitätsassay.....	52
2.2.9	Caspase-3-Aktivitäts-Assay	52
2.2.10	Ras-Aktivitäts-Assay	53
2.2.11	Adenosine 3', 5'-cyclic Monophosphat (cAMP) Assay	53
2.2.12	Zytotoxischer T-Zell-Assay	53
2.2.13	Chemotaxis-Assay	54
2.2.14	Zytokin-Array.....	54
2.2.15	Western Blot	55
2.2.16	Immunpräzipitation.....	56
2.2.17	Inhibitor-Studien.....	57
2.2.18	IL-16 ELISA.....	57
2.2.19	Immunofluoreszenzfärbung.....	57
2.2.20	RT-PCR	58
2.2.21	Liver histology and terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL)	60
3	ERGEBNISSE	61
3.1	Wirkung von hCG in Leberschädigungsmodellen der Maus	61
3.1.1	Effekt von hCG im akuten ConA-Modell	61
3.1.2	Einfluss von hCG auf akuten Leberschaden nach Apoptoseinduktion	62
3.1.3	Untersuchung der hCG-Wirkung bei lacBSA-induzierter chronischer Hepatitis.....	63
3.1.4	Mikroskopische Analyse der Lebergewebe.....	65
3.2	Analyse der hCG-Wirkung auf primäre Hepatozyten	66
3.2.1	Expression des LH/CG Rezeptors	66
3.2.2	Einfluss von hCG auf die CD95-induzierte Apoptose in primären humanen und murinen Hepatozyten	66
3.2.3	Wirkung von hCG auf die T-Zell-vermittelte Apoptose in Hepatozyten	67
3.3	Untersuchung der immunsuppressiven hCG-Wirkung	69
3.3.1	Zytokin Profile im Serum von Mäusen mit Leberschaden nach hCG-Behandlung.....	69
3.3.2	IL-16 Expression in Hepatozyten	71
3.3.3	Caspase-3-Aktivität und IL-16 Konzentration nach hCG-Behandlung in primären humanen Hepatozyten	72
3.3.4	Effekt von hCG auf die Chemotaxis von CD4 ⁺ T-Zellen durch IL-16....	73
3.3.5	IL-16 Konzentration im Serum von Patienten mit entzündlichen Lebererkrankungen.....	74
3.3.6	cAMP-Konzentration in Hepatozyten und der Leber nach hCG-Behandlung.....	75
3.4	Untersuchung des hCG-Signalweges in primären Hepatozyten.....	76
3.4.1	Wirkung von hCG auf die Proteinkinase Akt	76
3.4.2	Regulation der pro-apoptotischen Gene Bim und Puma.....	76
3.4.3	Lokalisation und Promotoraktivität von Foxo3a nach hCG-Behandlung	77
3.4.4	Inhibitorstudien.....	81
3.4.5	Effekt von hCG auf die Aktivität des G-Proteins Ras	82

3.5	Abhängigkeit des anti-apoptotischen hCG-Effektes von der Aktivität des Langlebigkeitsproteins Sirt1	84
3.5.1	Einfluss des Inhibitors Sirtinol für die Foxo3a abhängige hCG-Wirkung	84
3.5.2	Translokation und Modifikation von Sirt1 nach hCG-Behandlung	85
3.5.3	Wirkung von Sirt1 auf die transkriptionelle Aktivität von Foxo3a	88
3.5.4	hCG erhöht Deacetylierung von Foxo3a	89
4	DISKUSSION	90
4.1	hCG schützt vor akutem und chronischem Leberschaden	90
4.2	hCG hemmt Apoptose in primären Maus- und Humanhepatozyten	91
4.3	hCG verhindert die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-16 und die Einwanderung von T-Zellen in die Leber	92
4.4	hCG-Wirkung wird über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg vermittelt	94
4.5	hCG schützt vor Apoptose durch Regulation des Transkriptionsfaktors Foxo3a und seiner Zielgene Bim und Puma	94
4.6	hCG aktiviert das Langlebigkeitsprotein Sirt1	96
4.7	Fazit und Ausblick	97
5	LITERATURVERZEICHNIS	100
6	ANHANG	114
6.1	Abkürzungsverzeichnis	114
6.2	Abbildungsverzeichnis	116
6.3	Veröffentlichungen	117

1 EINLEITUNG

1.1 Autoimmunität und Schwangerschaft

Viele Autoimmunerkrankungen, wie Rheumatoide Arthritis, Thyroiditis, Multiple Sklerosis und Autoimmunhepatitis, verbessern sich spontan während der Schwangerschaft. Der genaue Mechanismus, warum es zu einer Verbesserung der Symptome kommt, konnte aber bis heute noch nicht vollständig geklärt werden (Kaaja, 2005).

Eine erfolgreiche Schwangerschaft kann nur dann bestehen, wenn das maternale Immunsystem genetisch inkompatibles, fetoplazentales Gewebe toleriert (Trowsdale and Betz, 2006, Aluvihare et al., 2005). Dabei spielen Th1- und Th2-Lymphozyten, die unterschiedliche Zytokine exprimieren, eine wichtige Rolle. Th1-Zellen sekretieren IFN γ , TNF β , IL-2 und TNF α und sind für die zelluläre Immunität verantwortlich, indem sie die Zelle vor Infektionen durch intrazelluläre Pathogene schützen. Eine Th2-Immunantwort hingegen zeichnet sich durch Bildung von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 aus, wodurch es zu einer starken Antikörperproduktion kommt als Schutz vor Infektionen durch extrazelluläre Organismen (Raghupathy, 2001). In der Schwangerschaft ist es wichtig, dass die Zytokine im richtigen Verhältnis zueinander stehen. Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass es in der Schwangerschaft zu einem Shift von Th1- zu Th2-Immunantworten kommt (Dudley et al., 1993, Reinhard et al., 1998) und dass übermäßige Th1-Immunantworten eine normale Schwangerschaft negativ beeinflussen (Wegmann et al., 1993, Raghupathy R, 1997, Hanna et al., 2000). Untersuchungen zeigen, dass sich Th1-induzierte Autoimmunerkrankungen meistens während der Schwangerschaft verbessern (Finkelsztejn et al., 2011). Lupus erythematoses hingegen gehört zu den Th-2-induzierten Autoimmunerkrankungen, bei der häufig eine Verschlechterung während der Schwangerschaft eintritt (Ruiz-Irastorza et al., 1996). Es ist bekannt, dass verschiedene Schwangerschaftshormone, unter anderem humanes Choriogonadotropin, immunsuppressiv wirken (Jeschke et al., 2001) und dass hCG essentiell für den Erhalt der Schwangerschaft ist, indem es das Corpus luteum zur Ausschüttung von Progesteron anregt (Kurtzman et al., 2001, Rao, 2001). Progesteron ist wiederherum wichtig für den Aufbau der Uterusschleimhaut.

In dieser Arbeit wurde die hCG-Wirkung in verschiedenen Mausmodellen mit autoimmuner Hepatitis untersucht. Es handelt sich hierbei um eine chronisch entzündliche Erkrankung der Leber, die hauptsächlich junge Frauen betrifft. Die Ursache ist bisher noch nicht geklärt, es scheinen aber sowohl genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse und Viren (Hepatitis A, B, C und D, sowie Masern- und Herpesviren) mit verantwortlich zu sein. Frauen mit Autoimmunhepatitis können schwanger werden und gesunde Kinder zur Welt bringen (Aggarwal, 2010). Buchel et al. konnten zeigen, dass sich von 14 Schwangerschaften mit autoimmuner Hepatitis 12 nach dem dritten Monat verbesserten, indem die Werte der Alanin-Aminotransferase (ALT), ein Blut-Parameter für Lebererkrankungen, sanken. Nach der Geburt kam es aber bei ebenfalls 12 der 14 Schwangerschaften zu einem erneuten Ausbruch der Hepatitis, was auf den immunsuppressiven Effekt während der Schwangerschaft zurückzuführen ist (Abb. 1; Buchel et al., 2002).

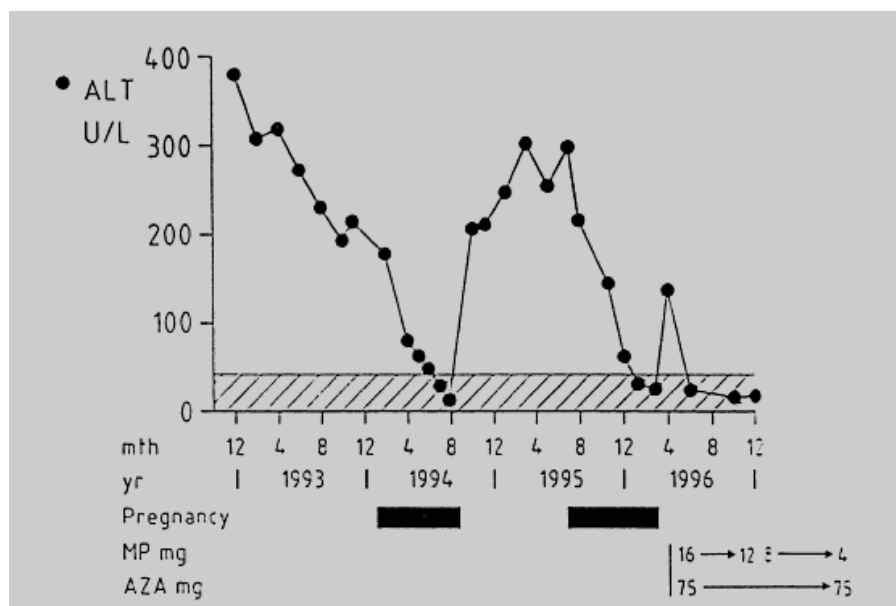


Abb. 1 Verlauf einer AIH während zwei Schwangerschaften

ALT-Werte zu Beginn der Diagnose der AIH, während der Schwangerschaften und der anschließenden Behandlung mit den Immunsuppressiva Azathioprin-/6-MP (Buchel et al., 2002)

1.2 Autoimmunhepatitis

Die Autoimmunhepatitis ist eine chronische Autoimmunkrankheit der Leber, die mit unspezifischen Symptomen wie Müdigkeit, Gelbsucht, Übelkeit, Gelenkschmerzen und Unterleibsschmerzen beginnt. Es gibt große Unterschiede in der klinischen Symptomatik, von einem asymptomatischen Verlauf bis hin zu einer akuten, schweren Erkrankung.

Bei der AIH kommt es zum Verlust von Hepatozyten-Antigenen, was zur Folge hat, dass die Hepatozyten von autoreaktiven T-Zellen als fremd erkannt und zerstört werden. Oo et al. haben herausgefunden, dass die Inflammation der Leber nicht nur aus Th-1 und Th-2 Zellen bestehen, sondern 5 % der T-Zell Infiltrate Th17-Zellen sind, die IL-17, IL-22, TNF- α und CCL20 produzieren. Th17-Zellen differenzieren sich aus naiven T-Zellen (Yang et al., 2008) unter dem Einfluss der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-23 und TGF- β (Wilson et al., 2007). Früher kannte man nur die Unterteilung zwischen Th1- und Th2-Zellen. Heute weiß man, dass vielen Autoimmunerkrankungen, wie Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerosis und primär biliäre Zirrhose, auch immunologische Reaktionen des Th17-Subtypes zuzuschreiben sind (Harada et al., 2009).

Longhi et al. haben des Weiteren gezeigt, dass weniger regulatorische T-Zellen (Tregs) in der Leber von AIH Patienten vorhanden sind und deren Funktion herabgesetzt ist. Tregs sind durch die Produktion des Transkriptionsfaktors Foxp3 charakterisiert. Es wird vermutet, dass ein Defekt in der Treg-Funktion für die Pathogenese von AIH mitverantwortlich ist (Longhi et al., 2008).

Charakteristisch für die Erkrankung ist die Zirkulierung von Autoantikörpern im Blut der Patienten. Besteht der Verdacht auf eine AIH kann dies mit Hilfe der Autoantikörper gegen SLA (soluble liver antigen) und LP (liver pancreas) im Serum nachgewiesen werden (Alvarez et al., 1999). Die Untersuchung des Serums ist aber für eine Diagnose noch nicht ausreichend. So ist zusätzlich die Histologie der Leber von entscheidender Bedeutung, bei der man eine Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen findet. Außerdem sind viele Plasmazellen und Eosinophile vorhanden. Bei allen Leberhistologien der Patienten kann man eine Fibrose erkennen und bei fortgeschrittener AIH wird eine Zirrhose der Leber sichtbar (Czaja und Manns, 2010).

Des Weiteren gibt es auch genetische Prädispositionen für die Krankheit, da hauptsächlich Frauen an AIH erkranken und bekannt ist, dass bestimmte HLAs (human leucocyte antigens), wie HLA B8, DR3 und DR4 in den Patienten vermehrt vorkommen (Teufel et al., 2006). Die Therapie der Autoimmunhepatitis besteht aus zwei Phasen. Sie beginnt mit der Gabe von hohen Dosen an Corticosteroiden, wobei hier das Mittel der Wahl Prednisolon ist. Sinken die Transaminasewerte und der Serumglobulinspiegel, wird die Dosis an Prednisolon herabgesetzt und zusätzlich als Immunsuppressivum Azathioprin eingesetzt. Unter dieser Therapie gelingt es bei

über 80% der Patienten eine Remission zu erreichen. Die Gabe der Medikamente sollte mindestens 12 Monate erfolgen und anschließend muss der Patient mindestens für weitere 12 Monate streng überwacht werden. Die Rückfallwahrscheinlichkeit liegt ohne Dauerbehandlung nach 6 Monaten bei 50% und nach drei Jahren bei über 70% (Oo et al., 2010). Aufgrund der starken Nebenwirkungen (Diabetes, Osteoporose, Bluthochdruck) der Corticosteroide und Immunsuppressiva ist die Suche nach alternativen Therapien unerlässlich.

1.3 Interleukin 16

Bei dem proinflammatorischen Zytokin Interleukin-16 (IL-16), das 1982 erstmals als „lymphocyte chemoattractant factor (LCF)“ beschrieben wurde (Cruikshank und Center, 1982), handelt es sich um ein Chemoattraktant für Lymphozyten, Eosinophile und Monozyten. IL-16 wird von verschiedenen Immunzellen, wie CD4⁺ und CD8⁺, Monozyten, B-Zellen, Eosinophilen, Mastzellen und dendritischen Zellen sowie von Epithelzellen, Fibroblasten und neuronalen Zellen exprimiert (Elssner et al., 2004; Kaser et al., 1999; Rumsaeng et al., 1997; Sciaky et al., 2000). Am besten wurde IL-16 als Produkt von T-Zellen untersucht. Dort wird es zunächst als Vorläufermolekül von 68 kDa, das 631 Aminosäuren umfasst, synthetisiert. Das Vorläufermolekül wird proteolytisch am Asparagin-Rest 510 durch aktive Caspase-3 gespalten und es entsteht ein 121 Aminosäuren großes reifes Protein, welches sekretiert wird. Der genaue Mechanismus für die Sekretion von IL-16 ist aber noch nicht verstanden.

Die Sequenzhomologie in allen untersuchten Spezies (Mensch, Affe, Rind, Ratte und Maus) ist sehr hoch, besonders in der C-terminalen Region, die für die Bindung und Aktivität wichtig ist (Nicoll et al., 1999). Dies zeigt, dass die Funktion von IL-16 evolutionär hoch konserviert ist und so Tiermodelle sich sehr gut für die Untersuchung der Bedeutung von IL-16 im Menschen eignen (Laberge und Cruikshank, 2008).

Für die Aktivität von IL-16 ist die Autoaggregation der IL-16 Monomere notwendig, die in einigen Zellen schon vor der Sekretion stattfindet. Die aktive Form hat man in CD8⁺ T-Zellen, Eosinophilen und Mastzellen gefunden, wobei in CD4⁺ Zellen nur das unprozessierte Vorläufermolekül vorkommt. Die Ausschüttung von IL-16 in CD8⁺-Zellen ist abhängig von der Art der Stimulation. Erfolgt die Stimulation mit Mito- oder Antigenen, so kann man IL-16 12-24 Stunden danach im Überstand finden (Wu et al., 1999). Werden die Zellen mit dem monoklonalen Antikörper anti-CD3 stimuliert,

wird IL-16 innerhalb von sechs Stunden freigesetzt und nach Histamin-Behandlung schon zwischen einer und vier Stunden (Laberge et al., 1995). CD4-Zellen generieren und sekretieren IL-16 nach der Stimulation des T-Zell-Rezeptors mit spezifischen Antigenen und mit immobilisierten monoklonalen anti-CD3 Antikörpern nach 12-24 Stunden.

IL-16 wirkt chemotaktisch auf alle Zellen, die CD4 auf ihrer Oberfläche exprimieren, wie T-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, Eosinophile, dendritische Zellen, B-Zell-Vorläufer und neuronale Zellen. Die Migration der T-Zellen kann durch die Koinkubation mit monomerischen Fab Fragmenten gegen CD4 inhibiert werden (Cruikshank et al., 1987). Man hat herausgefunden, dass IL-16 innerhalb der D4 Domäne von CD4 bindet, welche für die Dimer-Bildung von CD4 wichtig ist (Yang und Liu, 2000).

Die Sekretion von IL-16 steht in Zusammenhang mit Inflammationsprozessen in Krankheiten wie Asthma (Hessel et al., 1998a), rheumatoide Arthritis (Pritchard et al., 2004), Systemischer Lupus Erythematoses (Lard et al., 2002) und Multiple Sklerosis (Biddison et al., 1997). Laberge et al. konnten zeigen, dass die Expression von IL-16 in den Epithelzellen der Atemwege mit der Anzahl infiltrierender T-Zellen korreliert (Laberge et al., 1997), und in einem Mausmodell mit allergischem Asthma konnten anti-IL-16 Antikörper die Entwicklung bronchialer Überempfindlichkeit signifikant hemmen (Hessel et al., 1998b). Des Weiteren inhibiert IL-16 die HIV-Replikation in peripheren Blutzellen, indem es die HIV-1 Promotoraktivität reprimiert (Maciaszek et al., 1997). Zusammenfassend kann man sagen, dass IL-16 selbst oder IL-16 Antagonisten, wie z.Bsp. blockierende Peptide, für die Therapie von verschiedenen Immunkrankheiten sehr interessant sind.

1.4 Humanes Choriogonadotropin

1.4.1 Struktur und Funktion von hCG

Das humane Choriogonadotropin (hCG) ist ein Glykoprotein und hat ein Molekulargewicht von 37 kDa mit 237 Aminosäuren. Diese sind in zwei Untereinheiten aufgeteilt, die alpha- und die beta-Untereinheit. Die alpha-Untereinheit haben mehrere Hormone gemeinsam, wie das luteinisierende Hormon (LH), das follikelstimulierende Hormon (FSH) oder das Thyreotropin (TSH). Die beta-Untereinheit hingegen ist spezifisch für hCG. Der Nachweis von hCG im Serum ist

schon kurz nach der Befruchtung möglich und nach ca. acht bis zehn Wochen ist die Konzentration mit 15.000-200.000 IU/l am höchsten.

Neueste Studien zeigen, dass es vier Varianten von hCG gibt, die alle von unterschiedlichen Zellen mit unterschiedlichen Funktionen produziert werden (Cole, 2010). hCG wird hauptsächlich in der Plazenta von Zellen des Synzytiotrophoblasten produziert und sorgt dafür, dass das Corpus luteum die Produktion an Progesteron erhöht. Dies ist wichtig für den Aufbau der Uterusschleimhaut und die Einnistung der Blastocyste (Licht et al., 2007) sowie für den Erhalt der Schwangerschaft. Zygmunt et al. haben gezeigt, dass hCG außerdem die Angiogenese und Vaskulogenese in den Gefäßen der Gebärmutter fördert, wodurch die Versorgung mit Blut und Nährstoffen des Fetus gewährleistet wird (Zygmunt et al., 2003). Des Weiteren beeinflusst hCG die Immunantwort, indem es die Expression des MIFs (macrophage migration inhibitory factors) stimuliert und somit die Phagozytose von einwandernden Trophoblastenzellen blockiert (Akoum et al., 2005). Huynh konnte zeigen, dass hCG die IGF-I (Insulin-like growth factor) Expression in Hepatozyten hemmt. IGF ist ein starkes Mitogen für Brustkrebszellen (Huynh, 1998). Es wird angenommen, dass hCG ein entscheidender Faktor für die maternale Immuntoleranz ist, indem es den CD95L in Zellen des Endometriums hochreguliert und auch in der leukämischen T-Zelllinie Jurkat Apoptose induziert (Kayisli et al., 2003).

Die hyperglykolytierte Form von hCG (hCG-H) wird von den Zytotrophoblastenzellen produziert und wirkt autokrin, indem es das Wachstum des Trophoblasten unterstützt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Form die Apoptose in Krebszellen hemmt, indem es den TGF β -IIR verändert. (Cole et al., 2007). hCG-H führt zum Einwandern von Choriokarzinom-Zellen und es konnte gezeigt werden, dass die Blockade der alpha- und beta-Untereinheit mit einem spezifischen Antikörper das Wachstum von Choriokarzinomzellen vollständig unterdrückt (Lei et al., 1999). In der 3. Schwangerschaftswoche macht hCG-H den größten Anteil mit 87% des im Serum vorkommenden hCGs aus. Im 2. und 3. Trimester beträgt der Anteil nur noch weniger als 1%, was darauf hindeutet, dass die hyperglykosylierte Form wichtig für die Implantation ist (Cole et al., 2006).

Die freie Form von β -hCG ist die glykolytierte, monomerische Variante von hCG und hat ähnliche Funktionen wie die hyperglykolytierte Form von hCG. *In vitro* führt es zur Stimulation von Blasenkrebszellen, was durch die Verwendung blockierender Antikörper verhindert werden kann (Butler et al., 2003).

Die vierte Variante ist das hypophysäre hCG, welches innerhalb des Menstruationszyklus gebildet wird und dabei die Follikelreifung, den Eisprung und die Progesteronproduktion während des Zykluses, unterstützt (Cole, 2010).

1.4.2 Die hCG-Signalwege

hCG bindet an den LH/CG-Rezeptor, der zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembran (TM) Domänen gehört. α -hCG und β -hCG besitzen beide Bindestellen für den Rezeptor. Die extrazelluläre Domäne des hCG Rezeptors gehört zu der Proteinfamilie der Leucin-reichen Sequenzwiederholungen (LRR- leucin rich repeats), die verantwortlich für die hohe Affinität der Bindung sind (De Medeiros und Norman, 2009). Die Bindung von hCG an den Rezeptor induziert konformelle Änderungen in der zytoplasmatischen Domäne und die Signaltransduktion durch Aktivierung des G-Proteins beginnt (Abb. 2). G-Proteine sind aus drei Untereinheiten aufgebaut, α , β , und γ , wobei die α -Untereinheit eine GDP/GTP-Bindungsdomäne besitzt. Nachdem der G-Protein-gekoppelte Rezeptor aktiviert wurde, tauscht die α -Untereinheit ihr gebundenes GDP gegen GTP aus und dissoziiert von den zwei anderen Untereinheiten, wodurch die Adenylatzyklase aktiviert wird. Diese katalysiert die Bildung von zyklischem Adenosin-3'-5'-monophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP). cAMP ist ein wichtiger „second messenger“, der zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt (Abb. 2). Die Proteinkinase A ist für die Regulation des Energiestoffwechsels und für die Signalübertragung zwischen Zellen wichtig. Es handelt sich um ein tetrameres Protein, welches aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten aufgebaut ist. Die Aktivierung der PKA verläuft über die Bindung von zwei cAMP Molekülen an die R-Untereinheiten. Dadurch werden die C-Untereinheiten freigesetzt und katalytisch aktiv, indem sie spezifische Serin-, Threonin- und Tyrosinreste in Zielproteinen phosphorylieren. Weiterhin sind vier Isoformen der R-Untereinheit (RI α , RI β , RII α und RII β) und drei Isoformen der C-Untereinheit (C α , C β und C γ) bekannt. Sie sind für die Spezifität und Variabilität der PKA-Signalwege wichtig und werden je nach Zelltyp und Differenzierungsstatus unterschiedlich exprimiert. Cadd und McKnight haben gezeigt, dass im Zentralnervensystem und im Herz von Mäusen hauptsächlich RI α und im Rückenmark und Gehirn RI β exprimiert wird (Cadd und McKnight, 1989). RII α kommt vorwiegend im Herz und RII β in der Leber und in Fettgewebe vor (Cumplings et al., 1996). Innerhalb der Zelle wird die Lokalisation der

PKA durch die A-Kinase-Ankerproteine (AKAPs) vermittelt. Diese Proteine verankern die regulatorischen Untereinheiten an der N-terminalen Dimerisierungsdomäne der PKA des Typs II mit verschiedenen Organellen in der Zelle. Es gibt Zellen, die bis zu 15 verschiedene Ankerproteine in unterschiedlichen Kompartimenten exprimieren (Skalhegg und Tasken, 2000). PKA-abhängige Reaktionen sind z. Bsp. die Phosphorylierung von Ionenkanälen und Ionenpumpen, die Regulation der Glykolyse oder die Stimulation der Biosynthese von Schilddrüsenhormonen durch Thyreotropin. Außerdem ist sie für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der CREB -Familie (cAMP-responsive element-binding proteins) verantwortlich. Nach der Phosphorylierung von CREB werden mit Hilfe des Transkriptionskoaktivators CBP (CREB-binding Protein) die Transkription von Genen, die das cAMP responsive Element (CRE) enthalten, stimuliert.

Außerdem führt der Anstieg der cAMP Konzentration und die Aktivierung der PKA zur Synthese des „LH/hCG receptor mRNA-binding“ Proteins (LRBP). Dadurch werden Exo-und Endonukleasen aktiviert, die die Rezeptor mRNA zerstören und somit die Rezeptorexpression herunterregulieren (Menon et al., 2004).

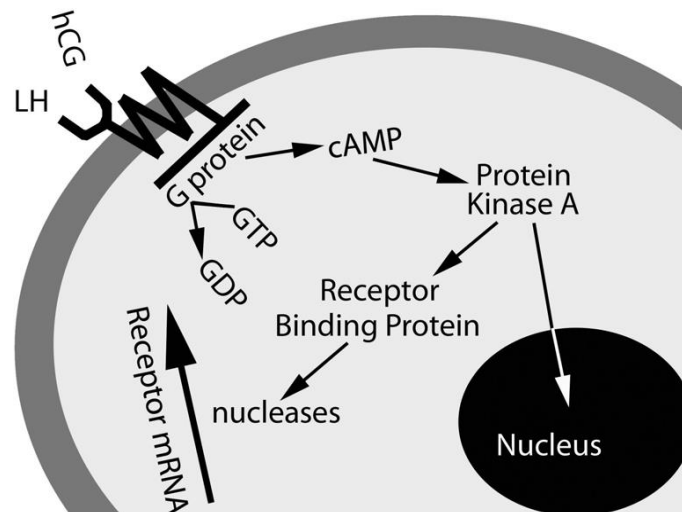


Abb. 2 Aktivierung des LH/CG Rezeptors

hCG bindet an den LH/CG Rezeptor, was eine Aktivierung des G-Proteins und somit der Adenylatzyklase zur Folge hat. Diese katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP. Die cAMP-abhängige Proteinkinase A ist an der Regulation des Energiestoffwechsel und vieler zelluläre Prozesse, wie Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt. Des Weiteren wird durch Rezeptor-Bindungsproteine die Expression des Rezeptors limitiert (Cole, 2010).

Wie bereits gezeigt führt hCG zur Aktivierung des PI3-Kinase/Akt Signalweges (Lima et al., 2006, Palaniappan and Menon, 2010). Dieser Signalweg spielt eine zentrale Rolle für das Wachstum, die Proliferation und das Überleben von Zellen. Er beginnt mit der Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-OH Kinase, indem Wachstumsfaktoren an Tyrosinkinaserzeptoren binden. Dies kann sowohl zur Dimerisierung des Tyrosinkinaserzeptors als auch zu dessen Autophosphorylierung an einem oder mehreren spezifischen Tyrosylresten führen. Daraufhin ist die PI3-Kinase in der Lage mit der sogenannten SH-Domäne an die phosphorylierte Rezeptortyrosinkinase zu binden und aktiviert zu werden. Ein weiterer Mechanismus, über den die PI3-Kinase aktiviert werden kann, ist die Bindung an die aktive Form der membrangebundenen Ras-GTPase.

Die katalytische Untereinheit der PI3K führt zu Bildung von Phosphatidylinositol (3,4,5) Triphosphat (PIP₃), indem sie an die Innenseite der Zellmembran wandert und dort Phosphatidylinositol (4,5) Bisphosphat (PIP₂) phosphoryliert. Es folgt die Rekrutierung von Akt (Proteinkinase B) an die Zellmembran, indem die PH (pleckstrin homology) -Domäne von Akt an PIP₃ bindet (Brunet et al., 2001). Die Aktivierung von Akt erfolgt durch andere Kinasen, wie der PDK1 und mTORC2, indem sie Akt an den Aminosäuren Thr308 und Ser473 phosphorylieren.

Akt reguliert eine Vielzahl an Substraten, wodurch viele zelluläre Prozesse entscheidend beeinflusst werden. In der Vergangenheit konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass Akt die FOXO Transkriptionsfaktoren, eine Untergruppe der „Forkhead“ Familie, reguliert (Brunet et al., 1999; Kops et al., 1999; Biggs et al., 1999). Dazu folgt eine nähere Betrachtung in Kapitel 1.6.1.

1.5 CD95-vermittelte Apoptose

1.5.1 Apoptose

Der Embryologe Glucksmann entdeckte 1951, dass das Absterben embryonalen Gewebes auf den Tod einzelner Zellen zurückzuführen ist (Glucksmann, 1951). Geprägt wurde der Begriff der Apoptose aber erst zwanzig Jahre später von Kerr, Wyllie und Currie, indem sie beobachteten, dass Toxin-behandelte Leberzellen ähnliche morphologische Veränderungen wie Embryonalzellen aufweisen (Kerr et al., 1972).

Der Prozess der Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, ist zusammen mit der Zellproliferation und Differenzierung entscheidend für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase. Kommt es zu einem Ungleichgewicht bei der Eliminierung von Zellen können ernsthafte Krankheiten entstehen. Zuviel Apoptose findet man bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer und Parkinson, sowie bei AIDS (Krammer et al., 2007). Zu wenig Apoptose hingegen kann zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Borgerson et al., 1999) und zur unkontrollierten Zellproliferation bei Krebserkrankungen führen. Im Immunsystem spielt Apoptose eine wichtige Rolle für die Regulation der Lymphozyten-Reifung und die Selektion des Rezeptor-Repertoires. Auch virusinfizierte, durch Mutationen geschädigte oder autoreaktive Immunzellen werden durch die Induktion von Apoptose beseitigt (Danial und Korsmeyer, 2004; Krammer et al., 2000). Apoptose kann durch zytotoxische T-Zellen über den CD95-abhängigen Signalweg, aber auch über die direkte Kaspaseaktivierung durch Granzyme induziert werden.

Im Gegensatz zur Nekrose, die passiv verläuft, ist die Apoptose ein streng kontrollierter Mechanismus, um einzelne Zellen zu eliminieren ohne die Funktion des umliegenden Gewebes zu beeinflussen. Die Apoptose beginnt mit der Schrumpfung der Zelle, das Zytoplasma und das Chromatin kondensieren. Es kommt zur DNA-Fragmentierung und man kann membranumschlossene Vesikel an der Zytoplasmamembran beobachten, die sogenannten „apoptotic bodies“. Anders als bei der Nekrose, bei der die Zelle bis zur Membranruptur anschwillt, bleibt die Zellmembran lange intakt, so dass eine lokale Entzündungsreaktion vermieden wird. Die apoptotischen Körperchen werden dann von Makrophagen phagozytiert.

Apoptose kann durch eine Vielzahl von Faktoren ausgelöst werden, wie z.B. UV- oder γ -Bestrahlung, chemotherapeutischen Medikamenten oder durch die Aktivierung von speziellen Zelloberflächenrezeptoren, den sogenannten „Todesrezeptoren“ (Death receptors).

1.5.2 Extrinsischer Signalweg und das CD95/CD95Ligand-System

Der extrinsische Signalweg, auch rezeptor-vermittelter Signalweg genannt, wird eingeleitet durch die Bindung eines extrazellulären Liganden oder agonistischen Antikörpers an seinen Rezeptor. Die „Todesrezeptoren“ gehören zur Familie der Tumor-Nekrosis-Faktor-Rezeptoren (TNF), von der acht Mitglieder charakterisiert

sind: TNFR1, CD95 (DR2, APO-1, Fas), DR3, „TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1“ (TRAILR1), TRAILR2, DR6, „ectodysplasin A receptor“ (EDAR) und „nerve growth factor receptor“ (NGFR) (French und Tschopp, 2003). Sie sind durch 1-5 cysteinreiche extrazelluläre Domänen und eine intrazelluläre Region, die sogenannte „Todesdomäne“, gekennzeichnet. Kommt es zur Interaktion der Rezeptoren mit korrespondierenden Liganden, wird eine Reihe von Molekülen zur Todesdomäne rekrutiert und die Signalkaskade wird aktiviert.

Der am besten untersuchte Todesrezeptor-Signalweg ist der des CD95 Rezeptors und seinem Liganden CD95L. 1989 wurde CD95, auch Fas oder APO-1 genannt, als erstes Apoptose-induzierendes Zelloberflächenmolekül beschrieben (Trauth et al., 1989). Der Typ I Transmembranrezeptor hat ein Molekulargewicht von 45-52 kDa und wird besonders im Thymus, Leber, Herz und Niere hoch exprimiert. Seine Expression kann durch Zytokine, wie Interferon- γ und TNF, sowie durch die Aktivierung von Lymphozyten verstärkt werden (Klas et al., 1993). Sein physiologischer Ligand, CD95L, wird hauptsächlich in aktivierten T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und in immunprivilegierten Organen wie die Augen und Hoden exprimiert. (Griffith et al., 1996). Es handelt sich um ein glykosyliertes Typ II Transmembranmolekül von 40 kDa.

Die Bindung von CD95L oder agonistischer Antikörper induziert die Trimerisierung des Rezeptors, was für die Weiterleitung der apoptotischen Signale notwendig ist. Daraufhin bindet das Adaptorprotein FADD (Fas-associated death domain protein) über die eigene Todesdomäne an die intrazelluläre Todesdomäne des CD95 Rezeptors. FADD enthält außerdem eine N-terminale Todes-Effektor-Domäne (death-effector-domain), mit der sie wiederum an die analoge Domäne der Procaspase-8, auch als FLICE bekannt, bindet. Der gesamte Komplex aus Ligand, trimerisiertem Rezeptor und Signalmolekülen wird als „death-inducing-signaling-complex“ (DISC) bezeichnet. Dies führt zur Aktivierung und Freisetzung der Caspase-8 ins Zytoplasma, welche in der Lage ist die Procaspasen-3,-4,-7 und -9 zu spalten und somit das Apoptoseprogramm zu starten (Abb.3).

Es gibt, abhängig vom Zelltyp, zwei verschiedene CD95-vermittelte Signalwege. In Typ I Zellen führt eine massive DISC-Bildung und damit eine große Menge an aktiver Caspase-8 zur direkten proteolytischen Spaltung von Caspase-3. Typ II Zellen, zu denen auch die Hepatozyten gehören, haben hingegen eine geringe DISC-Aktivität und somit auch eine niedrige Caspase-8 Aktivität. Diese spaltet das proapoptotische

Bcl-2 Protein Bid in die verkürzte Form tBid (truncated Bid), welches zu den Mitochondrien transloziert und zur Freisetzung von Cytochrom C führt (siehe 1.4.3). Der Apoptoseprozeß in Typ II Zellen ist demnach Mitochondrien-abhängig und kann durch die Überexpression von Bcl-2 und Bcl-x_L inhibiert werden (Scaffidi et al. 1998).

Für die Regulation und die Homöostase des Immunsystems ist Apoptose ein entscheidender Prozeß und das CD95/CD95L System spielt dabei eine wichtige Rolle für die T- und B-Zell-Entwicklung. Während einer akuten Immunantwort kommt es zu einer klonalen Expansion antigenspezifischer T-Zellen, deren Anzahl anschließend wieder durch Apoptose limitiert werden muss. Für die Eliminierung der T-Zellen sind zwei Mechanismen bekannt: restimulierte T-Zellen sterben am Ende der Immunantwort durch den sog. „activation-induced cell death“ (AICD), während aktivierte T-Zellen, die nicht restimuliert werden, durch den sog. „activated cell autonomous death“ (ACAD) sterben (Brenner et al., 2008). AICD ist ein Antigen-abhängiger Prozeß, der eine Empfindlichkeit gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose zur Folge hat. In aktivierten T-Zellen kommt es nach Stimulation des TCR-CD3-Komplexes zu einer verstärkten Expression des CD95L. ACAD ist ein Prozess, der durch den Entzug von Wachstumsfaktoren induziert und durch das BH-3 only Protein Bim vermittelt wird. Am Ende der Immunantwort bleiben nur wenige Zellen, die Gedächtniszellen (Memory T cells), übrig. Bei erneutem Kontakt mit dem Antigen können diese sofort aktiviert werden und eine Immunantwort auslösen.

Mittlerweile gibt es viele Mausstämme mit Mutationen im CD95/CD95L-System, die schwerwiegende Auswirkungen auf das Immunsystem haben, wie Lymphadenopathie und Autoimmunität. *Lpr*-Mäuse mit einem Spleißdefekt im CD95 Rezeptor Gen weisen ähnliche Symptome wie bei Lupus erythematosus auf. In *gld*-Mäusen führt eine Punktmutation am C-terminalen Ende des CD95 Liganden dazu, dass der Ligand nicht mehr an seinen Rezeptor binden kann. Bei beiden Mausmodellen kommt es zu einer enormen Akkumulation von T-Zellen (Nagata, 1998).

Beim Menschen ist eine ähnliche Krankheit bekannt, bei der die Funktion des CD95/CD95L-Systems gestört ist. Sie wird als „autoimmune lymphoproliferative syndrome“ ALPS bezeichnet. Kinder mit ALPS zeigen eine massive Lymphadenopathie und eine vergrößerte T-Zell Population. Zudem haben Erwachsene ein über 50% erhöhtes Risiko maligne Lymphome zu bekommen.

Deshalb ist man auf der Suche nach Medikamenten, die die Resistenz der aktivierten autoreaktiven T-Zellen gegenüber Apoptose, herabsetzen.

1.5.3 Intrinsischer (mitochondrialer) Signalweg

Der intrinsische Signalweg wird durch intra- oder extrazelluläre Stimuli, wie z.B. oxidativer Stress, Wachstumsfaktorenentzug, Chemotherapie oder Strahlung ausgelöst. Die Spaltung des Bcl-2 Proteins Bid in tBid führt zur Oligomerisierung der proapoptotischen Bcl-2 Proteine Bax und Bak (Wei et al., 2001). Diese Moleküle werden in die äußere mitochondriale Membran eingebaut und es kommt zur Membran-Permeabilisierung (MMP) (Antignani und Youle, 2006). Dies resultiert in einem Abfall des Transmembranpotentials, welches für die Produktion von ATP wichtig ist, und es kommt zur Freisetzung von Cytochrom C. Bid-defiziente Hepatozyten sind gegen TNF und CD95-induzierte Apoptose resistent (Zhao et al., 2003) und auch *in vivo* werden *Bid*-defiziente Mäuse weitgehend vor einem Leberversagen durch Endotoxin geschützt (Zhao et al., 2001). Daraufhin wird die Bildung des Apoptosoms induziert, ein Komplex bestehend aus Cytochrom C, Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor 1) und Procaspase-9. In diesem Komplex kommt es zur autokatalytischen Aktivierung von Caspase-9, die wiederum die Initiatorcaspase-3 aktiviert (Abb. 3). Sie spaltet zelluläre Substrate, die für den Aufbau des Zytoskeletts wichtig sind, wie z.B. Aktin und Gelsolin.

Einige Zellen, wie Hepatozyten oder Cholangiozyten, brauchen den mitochondrialen Signalweg zusätzlich zum extrinsischen Signalweg, um das apoptotische Signal der Todesrezeptoren zu verstärken.

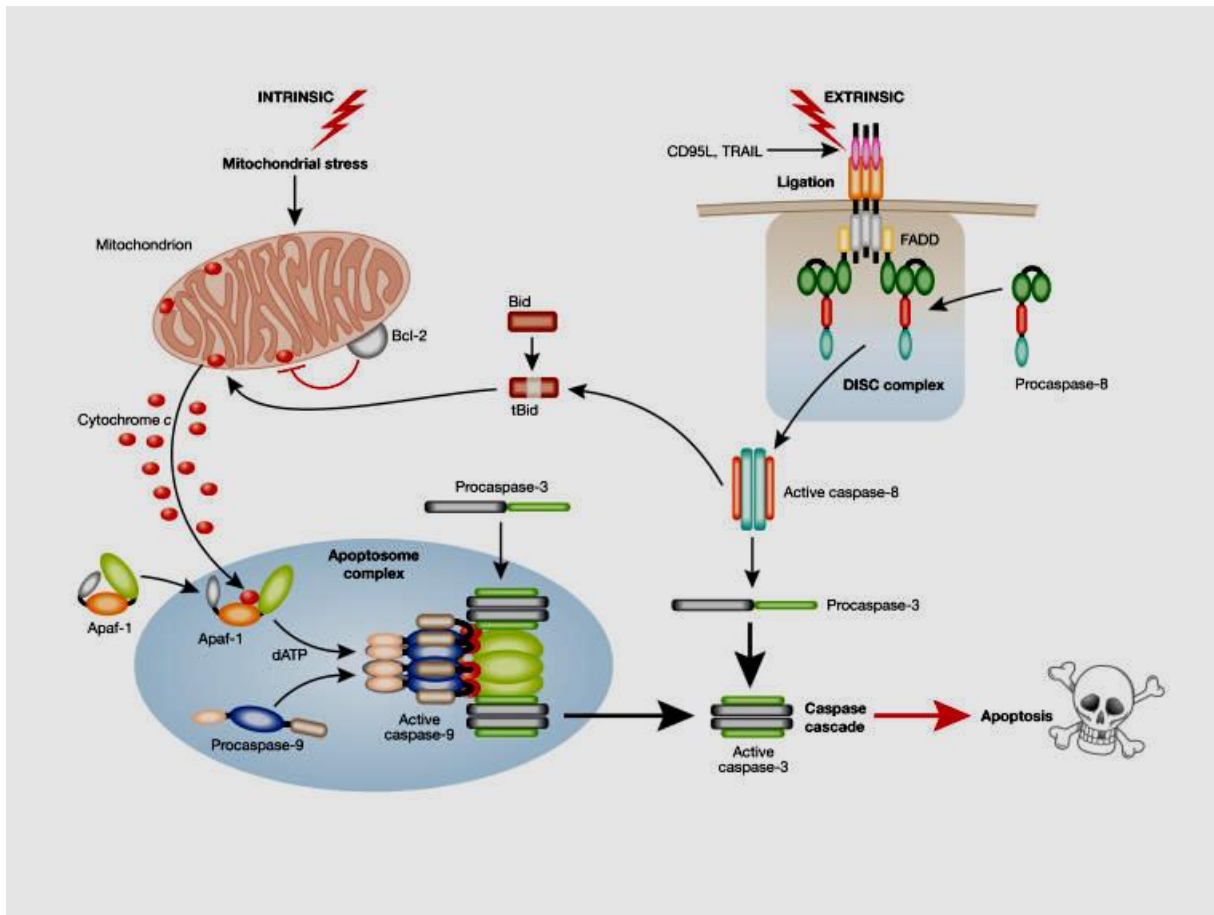


Abb. 3 Extrinsischer und intrinsischer Apoptoseweg

Die Apoptose kann eingeleitet werden durch Chemotherapeutika, UV-Strahlung, Stress Stimuli und Wachstumsfaktorenentzug (intrinsischer Signalweg, links) oder durch die Induktion von sogenannten Todesrezeptoren wie Fas (CD95) und TRAIL (extrinsischer Signalweg, rechts). (MacFarlane und Williams, 2004)

1.5.4 Bcl-2 Proteine

Die Proteine der Bcl-2 Familie, zu der sowohl pro- als auch antiapoptotische Proteine zählen, gehören zu den wichtigsten Regulatoren des intrinsischen Signalweges. In Säugetieren sind mindestens 20 Mitglieder dieser Familie bekannt, die alle vier konservierte Regionen, die sogenannten „Bcl-2 Homologie (BH) 1-4 Domänen“, besitzen (Cory und Adams, 2002). Des Weiteren wird die Familie in drei Unterklassen unterteilt, wobei zur ersten Unterklasse die antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1 gehören. Sie weisen die größte Homologie in allen vier BH Domänen auf und sind hauptsächlich an den Mitochondrien lokalisiert. Dort verbindet sie ein C-terminaler hydrophober Schwanz mit der äußeren Mitochondrienmembran, so dass der größte Teil des Proteins ins Cytosol hineinragt. Die zweite und dritte Unterklasse beinhaltet nur proapoptotische Proteine, die „multidomain Bax-like proteins“, zu denen Bax und Bad gehören und die „BH3 only proteins“ wie Bad, Bid,

Bim, Noxa und Puma. Die Expression der BH3-only Proteine kann durch Transkriptionsfaktoren induziert werden. So können Stress-Simuli zur Aktivierung von Puma (p53-upregulated modulator of apoptosis) durch p53, Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death) oder tBid führen, die wiederum zur Inaktivierung der antiapoptotischen Bcl-2 Mitglieder Bcl-2 und Bcl-2xL führen.

Bim ist das am besten untersuchte Mitglied der „BH3-only“ Familie und essentiell für die Apoptose von B-Zellen, T-Zellen, Neuronen und vielen anderen Zelltypen (Holz et al., 2010). In Säugetieren gibt es drei Isoformen, „Bim short“, „Bim long“ und „Bim extra long“, die alle von demselben Transkript synthetisiert werden. „Bim long“ und „Bim extra long“ sind die am häufigsten exprimierten Formen in normalem Gewebe. „Bim short“ hat die höchste Potenz Apoptose zu induzieren (O'Connor et al., 1998). Bim defiziente Mäuse weisen eine erhöhte Anzahl an T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Granulozyten sowohl im Blut als auch in Lymphknoten, Milz und Thymus auf (Bouillet et al., 1999).

Puma wurde erstmals 2001 als transkriptionelles Zielgen von p53 identifiziert (Nakano und Vousden, 2001; You et al., 2001) und als interagierender Partner von Bcl-2 Proteinen (Han et al., 2001). Mit über 90%iger Sequenzhomologie zwischen Maus und Mensch sowohl auf DNA als auch Proteinebene ist Puma hoch konserviert. Die Aktivierung von Puma erfolgt unter anderem durch den Transkriptionsfaktor p53 in Folge von DNA-Schädigung, verursacht durch genotoxische Agenzien (Yu et al., 2001, 2006) oder Gammastrahlung (Clarke et al., 1993; Lowe et al., 1993). Die Bindung von p53 an den Puma Promotor führt zur Modifizierung durch Acetylierung der Histone H3 und H4 und somit zur transkriptionellen Aktivierung (Wang et al., 2007). Außerdem sind noch eine Reihe anderer Transkriptionsfaktoren bekannt, die zur Induktion von Puma führen. Dazu gehört beispielsweise Foxo3a, ein Mitglied der „Forkhead Head“ Familie, welcher in Abhängigkeit von Zytokin- oder Wachstumsfaktoren-Entzug Puma aktiviert (You et al., 2006).

Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-2xL und Mcl-1 können an aktivierte proapoptotischen Proteine wie Bak (Bcl-2 antagonist/killer) und Bax (Bcl-2 associated X protein) binden und somit die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und die Freisetzung von Cytochrom C hemmen. So kann die Heterodimerisierung zwischen Bcl-2 und Bax die Sensitivität oder Resistenz von Zellen gegenüber Apoptose bestimmen.

1.5.5 CD95-vermittelte Apoptose in der Leber

Die Leber gehört zu den vielen nicht-lymphoiden Organen, die CD95 konstitutiv exprimieren. Man findet es sowohl in der sich entwickelnden als auch in der reifen Leber und es ist für die Gewebemöostase in der Leber entscheidend, so dass CD95-defiziente Mäuse z.B. eine hepatische Hyperplasie bekommen (Adachi et al., 1996). Wie hoch die Sensitivität der Leber gegenüber CD95 ist, wurde 1993 gezeigt, indem Mäuse nach der Injektion des agonistischen CD95 Antikörpers Jo2 innerhalb weniger Stunden an fulminantem Leberversagen starben (Ogasawara et al., 1993).

Eine Deregulation im CD95-vermittelten Apoptoseprozeß ist in vielen Erkrankungen der Leber zu finden: hepatozelluläres Karzinom (Strand et al., 1996), chronische virale Hepatitis (Tagashira et al., 2000), fulminantes Leberversagen (Galle et al., 1995), Autoimmunhepatitis (Fox CK et al., 2001), Wilson´s disease (Strand et al., 1998), HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets) Syndrom (Strand et al., 2004a), Lebertransplantat-Abstoßung (Tannapfel et al., 1999), nicht-alkoholische Steatohepatitis (Feldstein et al., 2003) und alkoholische Hepatitis (Natori et al., 2001). Dies zeigt, dass das CD95/CD95L-System sowohl für akute als auch für chronische Lebererkrankungen eine wichtige Rolle spielt (Guicciardi und Gores, 2005).

Erkrankungen wie das hepatozelluläre Karzinom hängen mit einer vermehrten Apoptoseresistenz zusammen und Erkrankungen, wie der Morbus Wilson oder das HELLP Syndrom, sind die Folge eines drastischen Apoptoseanstiegs. Das HELLP Syndrom ist eine besonders gefährliche Verlaufsform der Präeklampsie, einer Bluthochdruckerkrankung in der Schwangerschaft, mit einer schweren Leberfunktionsstörung. Strand et al haben gezeigt, dass das Lebergewebe von HELLP-Patientinnen einen hohen Anteil apoptotischer Zellen aufweist. Weiterhin konnten sie zeigen, dass im Serum dieser Patientinnen der CD95 Ligand zu finden ist, der zur Induktion von Apoptose in primären Hepatozyten führt. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Expression des CD95L in der Plazenta und seine Freisetzung über den Feto-maternalen Kreislauf ins Serum für die Leberschädigung dieser Schwangerschaftserkrankung verantwortlich ist (Strand et al., 2004a).

1.6 Langlebigkeitsproteine Foxo3a und Sirt1

1.6.1 Der Transkriptionsfaktor Foxo3a

Foxo3a gehört zu der FoxO Unterfamilie der Forkhead Transkriptionsfaktoren. Bei der FoxO Familie handelt es sich um hoch konservierte Gene, wobei bei Invertebraten ein Mitglied der FoxO Familie, *daf-16* in *Caenorhabditis elegans* und *dFOXO* in *Drosophila melanogaster*, gefunden wurden. Bei Säugetieren sind vier Mitglieder der FoxO Familie bekannt: FoxO1 (FKHR), FoxO3 (FKHRL1), FoxO4 (AFX) und FoxO6. Sie spielen in vielen zellulären Prozessen, wie Differenzierung, Proliferation, Entwicklung, Metabolismus, Apoptose, Stressresistenz und DNA-Reparatur-Mechanismen, entscheidende Rollen (Burgering und Kops, 2002). FoxO Proteine sind hauptsächlich Transkriptionsaktivatoren und binden über die N-terminale Forkhead-Domäne an die konservierte Konsensussequenz TTGTTTAC, die auch als „Forkhead-responsive element (FRE)“ bezeichnet wird. Des Weiteren besitzen sie eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD), eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) und ein nukleäres Exportsignal (NES) (Abb. 4). Die transkriptionale Aktivität wird durch verschiedene posttranslationale Mechanismen, wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und Ubiquitylierung, gesteuert. Dabei sind für die Regulation der FoxOs eine Vielzahl von Serin- und Threonin-Resten von Bedeutung (Van der Heide et al., 2000; Furuyama et al., 2000). Diese Aminosäuren sind zwischen Foxo1, Foxo3a und Foxo4 konserviert. In Abbildung 4 sind die Phosphorylierungsstellen und die dazugehörigen Kinasen von Foxo3a dargestellt. Die Proteinkinase MST1 (mammalian Ste20-like kinase) sorgt für die Aktivierung von Foxo3a, ausgelöst durch oxidativen Stress (Lehtinen et al., 2006), wobei die Kinasen Akt, SGK („serum and glucocorticoid-regulated kinase“), IKK β („Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase beta subunit“) und Erk („extracellular signal-regulated kinase“) als Inhibitoren von Foxo3a fungieren.

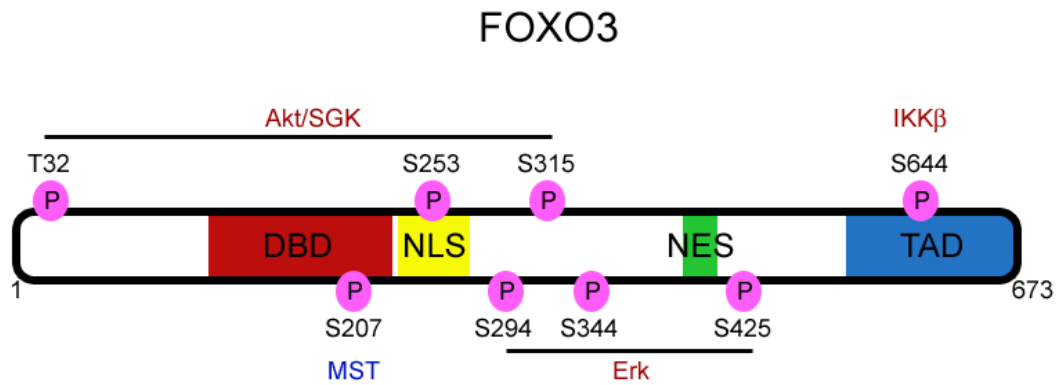


Abb. 4 Phosphorylierung von Foxo3a

Darstellung der Phosphorylierungsstellen von Foxo3a und die dafür verantwortlichen Kinasen. Akt/SGK, IKK β und Erk (rot) sind Inhibitoren von Foxo3a und MST (blau) aktiviert Foxo3a. DBD = DNA Bindungsdomäne, NLS = nukleäre Lokalisationssequenz, NES = nukleäres Exportsignal, TAD = Transaktivierungsdomäne (<http://www.cisreg.ca>)

FoxO Proteine werden durch Insulin bzw. Wachstumsfaktoren über den PI3K/Akt Signalweg reguliert. Dies zeigte unter anderem die Arbeitsgruppe von Brunet, indem sie Foxo3a als das Schlüsselgen im Insulin aktivierten Akt-Signalweg in Säugetieren identifizierte (Brunet et al., 2002).

Foxo3a verändert als Antwort auf verschiedene externe Stimuli seine zelluläre Lokalisation (Abb. 5) (Tsai et al., 2007). In Abbildung 5 ist der Mechanismus der FoxO Translokation dargestellt. Wachstumsfaktoren führen zur Aktivierung von Akt (Proteinkinase B), indem sie von der PDK (Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase) phosphoryliert wird und in den Zellkern wandert. Dort phosphoryliert Akt Foxo3a an drei konservierten Phosphorylierungsstellen und schafft zwei Bindestellen für das 14-3-3 Protein, dessen Bindung die Dissoziation von der DNA, eine Konformationsänderung von Foxo3a und somit den nukleären Export des Foxo/14-3-3 Komplexes mit Hilfe von Exportinen initiiert (Brunet et al., 1999). Die Interaktion zwischen Foxo3a und 14-3-3 Proteinen setzt eine Phosphorylierung am N-terminalen Akt Motif und am Akt Motif in der Forkhead Domain voraus. Eine Serin-Alanin Mutation in der N-terminalen Akt Domäne verhindert die Phosphorylierung von Foxo1 sowie die Bindung von 14-3-3 und den nukleären Export (Nakae et al., 2000). Im Zytoplasma bleiben die Foxo Proteine phosphoryliert und an 14-3-3 gebunden, wodurch die nukleäre Lokalisationssequenz maskiert und der Import in den Zellkern verhindert wird (Obsilova et al., 2005). Es folgt der Abbau der inaktiven FoxO Proteine durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg (Plas und Thompson, 2003).

Kommt es zu einem Entzug von Wachstumsfaktoren wird Foxo3a dephosphoryliert, der Komplex zwischen dem 14-3-3 Protein und Foxo3a wird gelöst und transloziert in

den Zellkern zurück, wo die Transkription seiner Zielgene stattfinden kann. Dazu zählen im Fall von Foxo3a die proapoptotischen Gene FasL, TRAIL, Bim und Puma, wichtige Zellzyklus und Checkpunkt Proteine wie p21 und p19 sowie Proteine des Zellmetabolismus wie die G6PC (Glucose-6-Phosphatase) und IGFBP1 (Insulin-like growth factor-binding protein 1).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus, über den FoxO Proteine reguliert werden, ist ihre Acetylierung. Unter Acetylierung versteht man die Übertragung eines Acetylrestes von Acetyl-CoA auf ein Substrat. Die Histon Acetyltransferasen (HATs) CBP/p300 und PCAF (P300/CBP-associated factor) können FoxOs direkt acetylieren, wobei Foxo3a an fünf Lysinresten am C-terminalen Ende acetyliert wird. Eine weitere Gruppe von Enzymen, die Histon Deacetylasen, entfernen Acetylreste von Proteinen. Dabei spielt die Deacetylase Sirt1, die zur Familie der Sirtuine gehört, eine sehr wichtige Rolle, die im nachfolgenden Kapitel näher betrachtet wird.

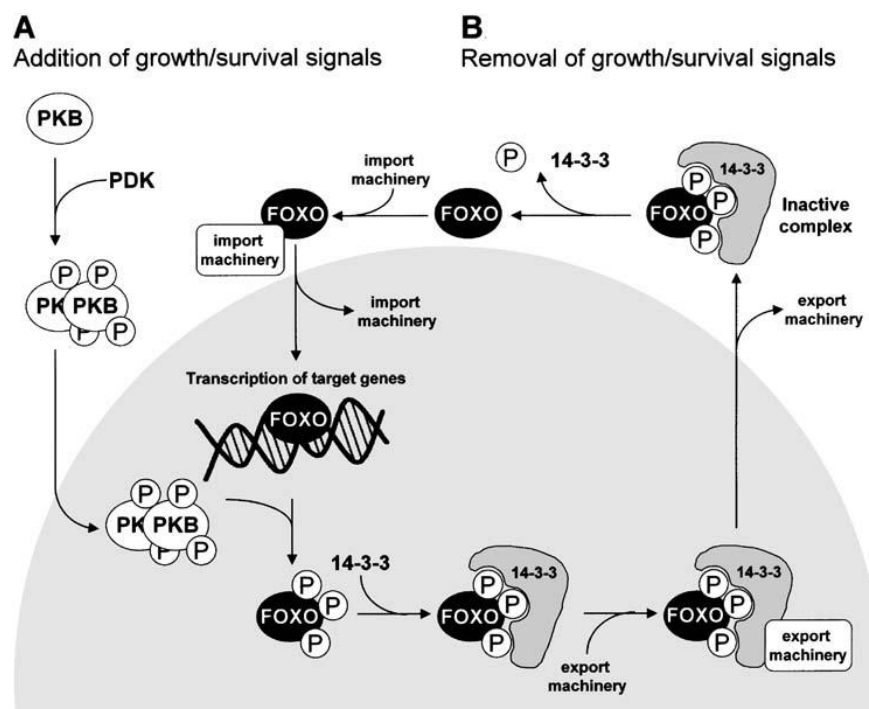


Abb. 5 Regulation der FoxO Proteine

A: Wachstumsfaktoren führen zu einer Phosphorylierung der Proteinkinase B (PKB), die in den Zellkern wandert und dort Foxo Proteine phosphoryliert, die mit 14-3-3 Proteine Komplexe bilden und aus dem Zellkern transportiert werden, wo sie inaktiv verbleiben

B: Der Entzug von Wachstumsfaktoren führt zur Dissoziation des 14-3-3 Proteins von Foxo, wodurch Foxo wieder in den Zellkern gelangt und seine Zielgene transkribiert werden (Birkenkamp und Coffey, 2003)

Gen-Array Analysen in Säugetierzellen haben gezeigt, dass Foxo3a unter Stressbedingungen die Expression von verschiedenen Genen der G2/M-Phase des

Zellzyklus beeinflusst. Dabei gehört das Gadd 45a Gen ("growth arrest and DNA damage response gene") zu den direkten Zielgenen von Foxo3a. Als Antwort auf geringe Stress-Stimuli führt Foxo3a zu einer Verzögerung in der G2-M Phase, so dass zerstörte DNA durch einen Gadd45a-abhängigen Mechanismus repariert werden kann. Auf der anderen Seite induziert Foxo3a unter erhöhten Stressbedingungen Apoptose. Aus diesem Grund ist Foxo3a wichtig für den Schutz vor DNA-Schäden, aber auch für die Eliminierung stark geschädigter Zellen. Dieser Mechanismus ist für die Lebensdauer von Lebewesen essentiell (Tran et al., 2002).

Auch Überexpressionsexperimente in *Drosophila* und dem Nematoden *C. elegans* haben gezeigt, dass die Foxo Transkriptionsfaktoren zu einer verlängerten Lebenszeit in Invertebraten führen (Giannakou et al., 2004; Henderson und Johnson, 2001).

Knockout Experimente zeigten, dass Foxo1-defiziente Embryonen am Tag 10,5 aufgrund einer fehlerhaften Gefäßentwicklung versterben. Bei Foxo3a-defizienten Mäusen ist zunächst kein Phänotyp erkennbar. Erst mit zunehmendem Alter werden die Weibchen frühzeitig unfruchtbar (im Alter von 10-15 Wochen), da die Entwicklung der Follikel in den Eierstöcken anormal ist (Hosaka et al., 2004). Außerdem sind sie leicht anämisch und haben eine bessere Glucosetoleranz als Wildtyp Mäuse. Des Weiteren weisen viele Organe, wie die Lunge, Speicheldrüse und Nieren, eine erhöhte Anzahl von T-Zellen und NFκB Aktivität auf, die auf eine Infiltration hinweist. Bei Foxo4-defizienten Mäusen sind bisher noch keine Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen bekannt und Foxo6 Knockout Mäuse werden zurzeit noch generiert.

Foxo3a wird in einer Vielzahl von Organen hoch exprimiert. In heranwachsenden Mäusen wurde die höchste Expression in der Leber und in adulten Tieren in Herz-, Gehirn-, Milz- und Nierengewebe festgestellt (Furuyama T et al., 2000). Untersuchungen von vielen verschiedenen humanen Zelltypen zeigten, dass Foxo3a in vielen Organen und Geweben vorhanden ist. In Patienten mit Ovarialkarzinomen ist die Expression von Foxo3a in den Tumoren reduziert (Fei et al., 2009).

1.6.2 Die NAD-abhängige Deacetylase Sirtuin1 (Sirt1)

Bei den „Silent Information regulator“ (Sir) Genen, genannt Sirtuine, handelt es sich um eine hochkonservierte Familie, die in allen Spezies von Bakterien bis zu den Säugetieren vorkommt. Sie gehören zu den Klasse III Histon-Deacetylasen und in Säugetieren wurden bislang sieben Sirtuine (Sirt1-Sirt7) gefunden. Alle Sirtuine sind

Deacetylasen oder Mono-ADP-Ribosyltransferasen und sind abhängig von oxidiertem Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺). Die Gensequenz von Sirt1 ist der des „silent mating type information regulation-2“ Gens (Sir2) homolog, welches zuerst in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt wurde (Kaeberlein et al., 1999). Anschließend wurde Sir2 auch in *Drosophila melanogaster* und *C. elegans* gefunden.

Die zelluläre Lokalisation der Sirtuine ist auf drei verschiedene Kompartimente verteilt. Sirt1, -2, -6 und 7 findet man im Zellkern, wobei Sirt1 und 2 auch im Zytoplasma vorkommen. Sirt3, -4 und 5 sind in den Mitochondrien lokalisiert (Kelly, 2010). Die Sirtuine sind in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Innerhalb der sieben Sirtuine ist Sirt1 am besten untersucht, wobei man eine hohe Expression in verschiedenen Gehirnregionen, wie z.Bsp. im Hypothalamus, im Herzen, in den Nieren, der Leber, dem Pankreas, den Muskeln, der Milz und im weißen Fettgewebe gefunden hat. Sirt2 ist im weißen und braunen Fettgewebe hochexprimiert wie auch im Gehirn und Nervensystem. Sirt3 wurde vor allem im metabolisch aktiven Gewebe, wie quergestreifte Skelettmuskulatur, braunes und weißes Fettgewebe, Herz, Niere und Leber, gefunden. Sirt4 kommt ebenfalls in metabolisch aktivem Gewebe vor, wie den Langerhanszellen im Pankreas. Sirt 5 findet man hauptsächlich in der Leber und die Expression von Sirt6 ist weit verbreitet mit der höchsten Konzentration in der quergestreiften Skelettmuskulatur, im Gehirn, Herz und in den Eierstöcken. Sirt7 kommt in Adipozyten und Kardiomyozyten vor (Michishita et al., 2005).

Die Deacetylierung von Proteinen durch Sirt1 beginnt mit der Hydrolysierung von NAD⁺ in einen ADP-Ribose-Rest und Nicotinamid. Anschließend wird eine Acetylgruppe von einem Protein, wie z.Bsp. Foxo3a, abgespalten und auf den ADP-Ribose-Rest übertragen, wobei 2'-O-acetyl-ADP-Ribose Nicotinamid entsteht.

Wie in Kapitel 1.6.1 beschrieben, werden die Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie durch posttranslationale Modifikationen reguliert und dabei ist die Deacetylierung durch Sirt1 von entscheidender Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass Sirt1 unter oxidativem Stress Foxo3a bindet und deacetyliert. Dadurch werden Gene des Zellzyklus-Arrestes aktiviert, die Resistenz gegenüber oxidativem Stress wird erhöht und die proapoptotischen Zielgene von Foxo3a können nicht mehr transkribiert werden (Brunet et al., 2004). Diese und andere Funktionen von Sirt 1 geben dem Protein den Namen als Langlebigkeitsgen, da es für die Balance zwischen Apoptose und Stressresistenz verantwortlich ist (Abb. 6). Ein weiteres

Zielgen von Sirt1 ist der Tumorsuppressor p53, dessen Deacetylierung seine transkriptionelle Aktivität inhibiert und Apoptose verhindert wird (Vaziri et al., 2001). Außerdem hat man p53 und Sirt1 in subnukleären Strukturen, den sogenannten Promyelocyten Leukemie Körpern (PML-Körper), kolokalisiert gefunden. Hier scheint Sirt1 an der Modulierung der Zellalterung beteiligt zu sein, indem es die PML-induzierte zelluläre Seneszenz verhindert (Langley et al., 2002). Andere Mechanismen, durch die Sirt1 das Überleben von Zellen reguliert, sind zum einen die Deacetylierung des DNA-Reperatur-Faktors Ku70, was zur Inhibierung der Bax-vermittelte Apoptose führt, (Cohen et al., 2004), oder des Tumor-Proteins 73 (tp73), dessen Deacetylierung ebenfalls zum Überleben der Zelle beiträgt (Dai et al., 2007).

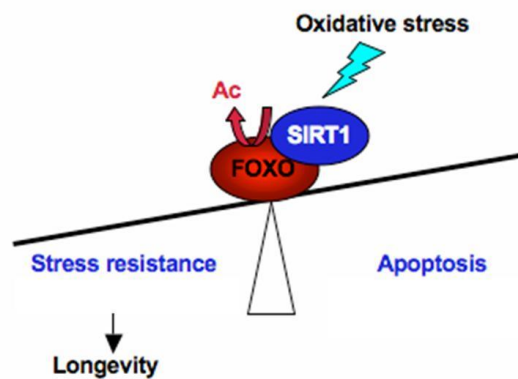


Abb. 6 Sirt1 als Langlebigkeitsgen

Ist eine Zelle oxidativem Stress ausgesetzt, führt Sirt1 zur Deacetylierung von FoxO Proteinen, wodurch die Induktion von Apoptose verhindert und Stressresistenz erreicht wird (nach Brunet et al., 2004 <http://www.stanford.edu/group/brunet/publications.html>).

Sirt1 Knockout Mäuse haben starke Defizite in ihrer Entwicklung. Sie haben eine geringere Geburtenrate, sind kleiner, entwickeln sich langsamer und nur etwa 20% überleben bis ins Erwachsenenalter. Die Mäuse sind steril, wobei die Männchen eine geringe Spermienzahl aufweisen und die Weibchen keinen Eisprung bekommen (McBurney et al., 2003). Hinzu kommt, dass die Morphogenese der Augen sowie die Unterteilung des Herzens gestört sind.

Untersuchungen in Hefen, Fliegen und Würmern haben gezeigt, dass die Überexpression von Sir2 die Langlebigkeit dieser Organismen erhöht. In *C.elegans* führt die Überexpression zu einer verlängerten Lebensdauer von 50%, abhängig von der Deacetylierung und Aktivierung von Daf-16, dem Ortholog des Foxo Proteins (Michan und Sinclair, 2007). Neueste Studien von Herranz et al. konnten zeigen, dass transgene Mäuse, die Sirt1 dreifach überexpressieren (Sirt1-tg Mäuse), vor

Diabetes, Osteoporose und Karzinomen und Sarkomen geschützt sind. Es konnten weniger DNA-Schäden und eine niedrige Expression von p16^{INK4a} gezeigt werden. Ein Einfluss von Sirt1 bei der Ausbildung von Lymphomen konnte allerdings nicht festgestellt werden. Darüber hinaus entwickelte die Arbeitsgruppe ein neues Leberkrebs-Modell, indem den Sirt1-tg Mäusen das Leberkarzinogen Diethylnitrosamin (DEN) verabreicht und sie anschließend einer fettreichen Diät ausgesetzt wurden, die zusätzlich Leberkrebs durch eine systemische Inflammation auslösen kann. Die Sirt1-tg Mäuse waren sowohl vor drastischen DNA-Schäden durch das DEN als auch vor der Inflammation, als Folge der Diät, geschützt. Diese Ergebnisse zeigen, dass Sirt1 auch für die Langlebigkeit von Säugetieren eine wichtige Rolle spielt und der Entstehung von Alters- und Übergewicht-bedingtem Krebs entgegenwirkt (Herranz et al., 2010).

In den letzten Jahren wurden mehrere Inhibitoren und Aktivatoren gefunden, die die enzymatische Aktivität von Sirt1 beeinflussen und somit Sirt1 therapeutisch für die Modulation von Langlebigkeit sehr interessant machen (Howitz et al., 2003; Napper, et al., 2005).

1.7 Mausmodelle für autoimmune Hepatitis

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Mausmodelle mit immunvermitteltem Leberschaden verwendet. Zum einen wurden Mäuse mit ConA oder dem anti-CD95 Antikörper Jo2 behandelt, um ein akutes Leberversagen hervorzurufen, und zum anderen entwickelten Mäuse durch die Gabe von lactosylierten BSA über mehrere Wochen einen chronischen Leberschaden.

1.7.1 Akute Hepatitis induziert durch Concanavalin A

Bei ConcanavalinA handelt es sich um ein Protein aus der Schwertbohne (*Canavalia ensiformis*), welches zur Gruppe der Lektine gehört. Lektine sind zuckerbindende Glykoproteine, die zellagglutinierende Eigenschaften haben. Bereits 1973 haben Asherson und seine Arbeitsgruppe gezeigt, dass ConA *in vitro* ein effektives Mitogen für T-Zellen ist (Asherson et al., 1973), und 1992 konnten Tiegs et al. in Mäusen durch die Injektion von ConA akutes Leberversagen induzieren. Der Leberschaden zeichnet sich durch hohe Transaminasewerte (Glutamat-Pyruvat-Transaminase und Glutamat-Oxalacetat-Transferase) im Serum, Infiltration von T-Zellen und massive

Degeneration der Hepatozyten bis zur Nekrose aus. Bis heute sind die Gründe hierfür vielfach diskutiert worden. Man geht davon aus, dass für den Leberschaden vor allem T-Zellen verantwortlich sind, denn B- und T-Zell-defiziente Mäuse (SCID-Mäuse= severe combined immunodeficiency syndrome) entwickeln nach ConA-Injektion keine Hepatitis. So schützt auch die Vorbehandlung der Mäuse mit monoklonalen anti-CD4 Antikörpern vor dem ConA-induzierten Leberschaden, wohingegen anti-CD8 Antikörper keinen Schutz bieten. Des Weiteren verhindert die Behandlung mit den Zytostatika FK506 und CyclosporinA die Ausbildung der ConA-bedingten Hepatitis. FK506 und CyclosporinA sind Immunsuppressiva, die hauptsächlich nach Organtransplantationen eingesetzt werden, um die Proliferation und Aktivität von T-Zellen zu hemmen (Farghali und Masek, 1998). Auch die Zerstörung der Makrophagen mit Hilfe von Silicia Partikeln verhindert den Leberschaden durch ConA. Diese Ergebnisse zeigen, dass der ConA-induzierte Leberschaden wahrscheinlich durch die Interaktion von Makrophagen und T_H-Zellen, wodurch die T_H-Zellen aktiviert werden, vermittelt wird. Diese Vermutung wird auch durch den Anstieg von IL-2 im Serum, welches für die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen wichtig ist, gestützt (Tiegs et al., 1992).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von Zytokinen, die auch bei Leberentzündungen im Menschen wichtig sind, bei diesem Tiermodell bedeutende Rollen spielen. So ist z.Bsp. die TNF- α Konzentration im Serum ConA behandelter Tiere erhöht und Mäuse, denen einer der beiden TNF- α Rezeptoren fehlt (TNFR-1 und TNFR2) (Küsters et al., 1997), sowie auch TNF- α Knockout-Mäuse sind vor der Leberschädigung durch ConA geschützt. Außerdem wurde untersucht, ob IFN- γ Knockout-Mäuse ebenfalls vor ConA-induzierter Hepatitis geschützt sind. Dies konnte bestätigt werden, wie auch die Vorbehandlung mit anti-IFN- γ Antikörpern Mäuse vor dem akuten Leberschaden bewahrt (Küsters et al., 1996). Des Weiteren gibt es eine Reihe von Interleukinen, die an der Leberschädigung beteiligt sind, wie IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 und IL-18. IL-10 hingegen hat einen protektiven Effekt in diesem Hepatitis-Modell (Di Marco et al., 1999).

Es gibt viele Hinweise auf die Beteiligung des Fas/FasL-Systems während der Leberschädigung durch ConA. Fas- und Fas-Ligand-defiziente Mäuse weisen beide nach ConA-Injektion niedrige Aminotransferase-Werte auf (Seino et al., 1997) und die Vorbehandlung mit Fas siRNA reduziert die hepatozelluläre Nekrose, die inflammatorische Infiltration und die Transaminasewerte im Serum (Song et al.,

2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression des Fas Liganden nach ConA Injektion ansteigt (Ksontini et al., 2003). Tagawa et al. zeigten, dass die mRNA Expression von Fas in ConA behandelten Mäusen erhöht ist und dabei IFN- γ eine entscheidende Rolle spielt, da in IFN- γ Knockout Mäusen dies nicht der Fall ist (Tagawa et al., 1997).

1.7.2 Chronische Hepatitis induziert durch lacBSA

Die Behandlung von Mäusen mit lactosylierten BSA führt zu einer T-Zell-vermittelten Immunantwort, wodurch die Leber erheblich geschädigt wird (Xu et al., 2006). Der Vorteil gegenüber dem ConA Modell ist, dass durch Verwendung eines löslichen Antigens dieses gezielt zu einem bestimmten Organ gebracht wird. In diesem Modell wird lactosyliertes BSA verwendet, da Hepatozyten den Asialoglycoprotein Rezeptor (ASGPR) besitzen. Dieser ist in der Lage Glycoproteine zu binden und durch Rezeptor-vermittelte Endozytose aus dem Blut zu entfernen. Antikörper gegen den ASPGR sind häufig ein Hinweis auf eine Autoimmunhepatitis.

Des Weiteren haben Xu et al. gezeigt, dass man in diesem Modell eine Hochregulation von Fas und FasL mRNA findet. Sechs Stunden nach lacBSA Injektion zeigt sich eine erhöhte Fas-Expression in der Leber, die über 18 Stunden konstant bleibt. Eine Expression des FasL, ein Marker für aktivierte Lymphozyten, findet man sechs Stunden und ein Abfall 18 Stunden nach der Behandlung. Diese Ergebnisse deuten auf eine Infiltration von aktivierten Lymphozyten hin. In der Histologie wurde ebenso eine Infiltration von Granulozyten und Lymphozyten gefunden sowie eine Zerstörung der Hepatozyten und eine Verfettung der Leber.

In dieser Arbeit wurde dieses akute lacBSA-Modell modifiziert, um einen chronischen Leberschaden zu induzieren. Dazu wurden die Mäuse zweimal in einem Abstand von 6 Tagen mit der subkutanen Injektion von BSA sensibilisiert. Im Gegensatz zu dem lacBSA Modell für akuten Leberschaden wurde eine geringere Dosis des lactosylierten BSAs verwendet und intraperitoneal über mehrere Wochen injiziert (Abb. 7). Dadurch entwickelte sich eine immunvermittelte chronische Hepatitis in den Mäusen.

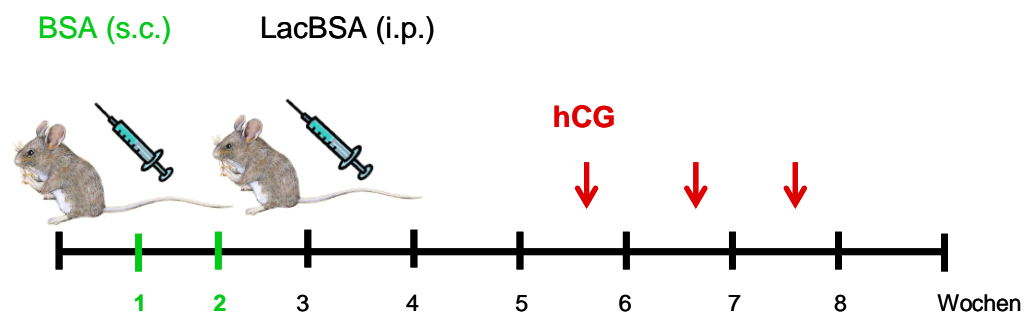


Abb. 7 Modell für chronischen Leberschaden in Mäusen induziert durch lactosyliertes BSA
Die Mäuse wurden zweimal im Abstand von 1 Woche mit BSA sensibilisiert und anschließend mit lactosyliertem BSA behandelt, bevor nach 5 Wochen der Einsatz von hCG erfolgte.

1.8 Fragestellung und Zielsetzung

Die Behandlung von Autoimmunerkrankungen, wie der Autoimmunhepatitis, ist auf Grund mangelnden Wissens über die Ursachen oft sehr schwierig und meist auf die Linderung der Symptome beschränkt. Zudem sind die heute eingesetzten Corticosteroide und Immunsuppressiva mit starken Nebenwirkungen verbunden, die erheblich die Lebensqualität beeinflussen, wie Bluthochdruck, hohe Cholesterinwerte, Diabetes, größere Infektionsgefahr und Tumorrisiko. Deshalb ist man auf der Suche nach neuen Medikamenten, die effektiv das betroffene Lebergewebe vor dem Angriff des eigenen Immunsystems schützen und gleichzeitig gut vom Körper toleriert werden.

Es ist bekannt, dass sich die klinischen Symptome der Autoimmunhepatitis während der Schwangerschaft verbessern (Buchel et al., 2002), wobei die Ursachen hierfür noch weitgehend ungeklärt sind.

Während einer Schwangerschaft ist das maternale Immunsystem einer besonderen Situation ausgesetzt. Es muss dafür sorgen, dass embryonales Gewebe nicht als fremd erkannt und toleriert wird, aber gleichzeitig dürfen Abwehrmechanismen, die Infektionskrankheiten verhindern, nicht geschwächt werden. Ein wichtiger Mechanismus für die lokale, maternale Immuntoleranz ist die Abwehr reaktiver T-Zellen. Dabei spielt humanes Choriogonadotropin eine entscheidende Rolle, da es die Expression des Apoptose-induzierenden CD95-Liganden in endometrialen Zellen stimuliert (Kayisli et al., 2003). hCG gehört zu den ersten hormonellen Signalen während der Einnistung der Blastozyste und wird bereits seit vielen Jahren erfolgreich als Medikament für die Behandlung von Infertilität eingesetzt.

Ziel dieser Studie war es in krankheitsrelevanten Leberschädigungsmodellen der Autoimmunhepatitis eine potentiell therapeutische Wirkung von hCG zu untersuchen. Dazu sollte *in vitro* analysiert werden, ob hCG primäre humane und murine Hepatozyten vor CD95-vermittelter Apoptose schützt und welche Signalwege hierfür verantwortlich sind. Hierbei sollte die Apoptose-Induktion sowohl durch agonistische CD95-Antikörper als auch durch zytotoxische T-Zellen in Kokultorexperimenten erfolgen. Die Untersuchung des Signalweges sollte mit der Analyse der Genprofile hCG-behandelter primärer humaner Hepatozyten beginnen und dann durch proteinbiochemische Methoden ergänzt und bestätigt werden. Des Weiteren stand im Fokus dieser Arbeit die Wirkung von hCG in verschiedenen Tiermodellen mit akutem

und chronischem Leberschaden und dessen Einfluss auf das Immunsystem. Hierfür sollte ein Vergleich der Zytokinprofile im Blut hCG-behandelter und unbehandelter Tiere mittels ELISA erfolgen sowie der Effekt von hCG auf die Einwanderung von autoaggressiven T-Zellen in die Leber untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Primärantikörper	Herkunft/Beschreibung	Referenz
Anti-Acetylated Lysine	Kaninchen, WB 1:1000	Cell Signaling
Anti-Akt	Kaninchen, WB 1:1000	Cell Signaling
Anti-Aktin	Maus, WB 1:1000	Neo-Markers
Anti-Apo-1	Maus,	Peter Krammer
Anti-Bim	Kaninchen, WB 1:1000	eBioscience
Anti-CD4 ⁺	Ratte, IF:1:100	eBioscience
Anti- CD95 (Klon Jo-2)	Maus	BD Pharmingen
Anti-FOXO3a	Kaninchen, WB 1:1000 IP: 1:100	Cell Signaling
Anti-HA	Kaninchen, IF 1:1000	Abcam
Anti-IL-16	Kaninchen, IF 1:100	Abcam
Anti-phospho-Akt	Kaninchen, WB 1:1000	Cell Signaling
Anti-phospho-Sirt1	Kaninchen, WB 1:1000, IF:1:100	Cell Signaling
Anti-Puma	Kaninchen, WB 1:1000	Cell Signaling
Anti-Sirt1	Maus, WB: 1000, IF 1:500	Actif motif

Sekundärantikörper	Affinität/Beschreibung	Referenz
Alexa Fluor 488	Kaninchen IgG, IF 1:200	Invitrogen
Alexa Fluor 555	Ratte IgG, IF 1:200	Invitrogen
Hoechst 33342	Nukleus 1:10000	Molecular Probes
Anti-mouse immunoglobulin ALP- conjugated	Maus, 1:15000	Sigma Aldrich
Anti-rabbit immunoglobulin ALP-conjugated	Kaninchen, 1:15000	Sigma Aldrich

2.1.2 Plasmide

Alle verwendeten Plasmide wurden von der Firma Addgene in Cambridge (USA) bezogen.

Nummer	Gen	Ursprung
1791	Flag-Sirt1	Michael Greenberg
1792	Flag-Sirt1 H363Y	Michael Greenberg
8355	HA-FOXO3a WT-ER	Michael Greenberg
8354	HA-FOXO3a TM-ER-delta DB	Michael Greenberg
8353	HA-FOXO3a TM-ER	Michael Greenberg
1789	FHRE-Luc	Michael Greenberg

Abbildung 8 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Foxo3a Plasmide. Sie besitzen alle ein HA-tag, eine DNA Bindungsdomäne, eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS), ein nukleäres Exportsignal (NES) und am COOH Terminus eine Ligandbindungsdomäne des Östrogenrezeptors (ER). Der ER-Teil wurde so mutiert, dass nur 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) und nicht endogenes Östrogen an den Rezeptor binden kann. Bei HA-Foxo3a WT-ER handelt es sich um das unmutierte Foxo3a Wildtyp (WT) Plasmid. Das HA-Foxo3a TM-ER Plasmid wurde so verändert, dass die Akt Phosphorylierungsstellen Thr³², Ser²⁵³ und Ser³¹⁵ im Foxo3a Teil durch Alanin ersetzt wurden, so dass Akt diese nicht mehr phosphorylieren kann. Bei HA-Foxo3a TM-ER-delta DB handelt es sich um ein Plasmid, welches eine Deletion in der DNA-Bindungsdomäne (DBD) hat (Brunet et al., 1999; Tran et al., 2002).

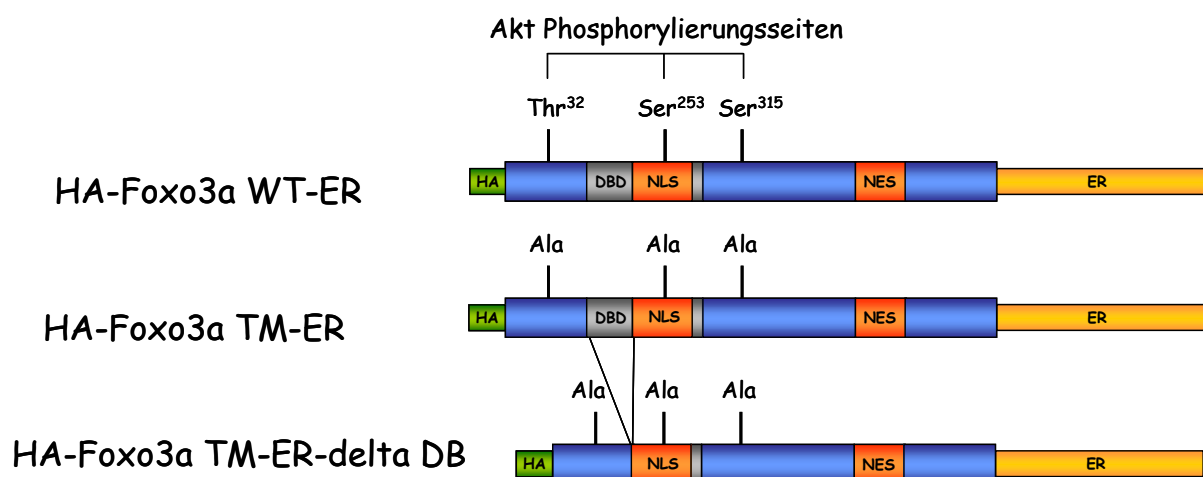


Abb. 8 Übersicht der verwendeten Foxo3a Plasmide

Bei den HA-Foxo3aTM-ER und HA-Foxo3aTM-ER-deltaDB Plasmiden wurden die Akt Phosphorylierungsstellen Thr³², Ser²⁵³ und Ser³¹⁵ durch Alanin ersetzt und das HA-Foxo3a TM-ER-delta DB Plasmid besitzt zusätzlich eine Deletion in der DNA Bindungsdomäne (DBD). NLS= nukleäre Lokalisationssequenz, NES= nukleäres Exportsignal, ER = Östrogenrezeptor, WT= Wildtyp, TM= Triple-Mutante

Wie bereits in Abbildung 8 gezeigt besitzen alle Foxo3a Plasmide eine mutierte Ligandbindungsdomäne des Östrogenrezeptors, die nur auf 4-Hydroxytamoxifen und nicht auf Östrogen reagiert (Littlewood et al., 1995). In der Abwesenheit von Liganden sind Fusionsproteine mit Hormonbindungsdomänen inaktiv, weil sie einen Komplex mit verschiedenen intrazellulären Polypeptiden, am häufigsten mit dem Hitzeschockprotein Hsp90, bilden (Smith und Toft, 1993). Nach Bindung des Liganden dissoziiert der inhibitorische Komplex vom Rezeptor.

Der Östrogen- rezeptor wird am häufigsten als regulatorische Domäne verwendet, wie auch in den Foxo3a Plasmiden. Ohne Tamoxifen ist das Foxo3a-Fusionsprotein inaktiv und bleibt im Zytoplasma, weil es an einen Komplex des Chaperons Hsp90 gebunden ist. Nach Zugabe von 4-OHT und Bindung an den Rezeptor, dissoziiert der inhibitorische Komplex von der ER-Domäne, so dass das Foxo3a-Plasmid in den Kern translozieren kann.

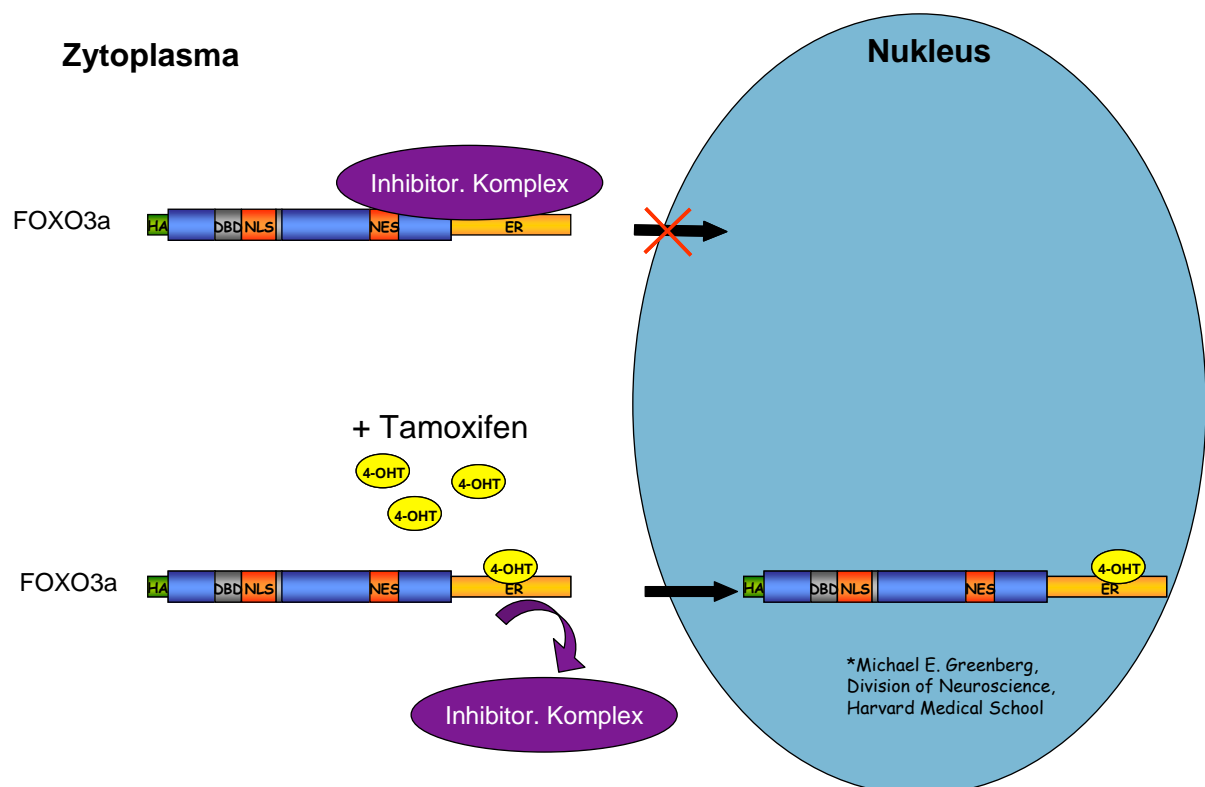


Abb. 9 Prinzip der verwendeten Plasmide

In der Abwesenheit von Tamoxifen bleibt das Plasmid inaktiv im Zytoplasma, da die ER-Domäne an einen inhibitorischen Komplex des Hsp90 Proteins gebunden ist. Die Zugabe von 4-OHT führt zur Freisetzung des Rezeptors, so dass das Foxo3a Plasmid aktiviert wird und in den Zellkern transloziert.

2.1.3 Oligonukleotid-Primer

Die Synthese der Primer wurde von der Firma Eurofins MWG Operon übernommen.

Gen	Sequenz	Annealing-Temperatur
Bim	Forward 5'-AACCACTATCTCAGTGCAAT-3'	58°C
	Reverse 5'-GGTCTTCGGCTGCTTGGTAA-3'	
Puma	Forward 5'TGGAGGGTCCTGTACAATCTC-3'	58°C
	Reverse 5'-AGTCCAGTATGCTACATGGTG-3'	
RplI	Forward 5'-GCACCACGTCCAATGACAT-3'	60°C
	Reverse 5'-GTGCGGCTGCTTCCATAA-3'	

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenzie	Firma
Accutase™	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Acrylamid	Merck Biosciences, Darmstadt
Aceton	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agarose	Calbiochem, Darmstadt
Albumin Fraktion V (Bovines Serumalbumin, BSA)	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
Aqua Braun, bidestilliert	B. Braun, Melsungen
Bacto Agar	Calbiochem, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck Biosciences, Darmstadt
Butanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
CDP-Star®	Tropix, Bedford, USA
Collagenase NB 4G	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Collagenase NB 8	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Diethanolamin (DEA)	Tropix, Bedford, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich, München
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (fetal calf serum, FCS)	Biochrom AG, Berlin
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
HEPES-Puffer	Lonza, Belgien
I-Block.™	Applied Biosystems, Foster City, USA
iCycler Absolute QPCR SYBR Green Mix	ABgene, Blenheim, UK
Igepal (NP-40)	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Biosciences, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat-Dihydrat (KH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O)	Merck Biosciences, Darmstadt

L-Glutamin, 200 mM	Invitrogen™, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, München
β-Mercaptoethanol Merck Biosciences	Merck Biosciences, Darmstadt
Methanol	AppliChem, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O)	Merck Biosciences, Darmstadt
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, München
Nitroblock II™	Applied Biosystems, Foster City, USA
Paraformaldehyd (PFA, 4%)	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptavidin	Invitrogen™, Karlsruhe
PermaFluor™ Aqueous Mounting Medium	Thermo Fisher Scientific, Lafayette, USA
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, München
Roti-Nanoquant	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, München
Trihydroxymethylaminomethane (Tris)	AppliChem, Darmstadt
TransFectin Lipid Reagent	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Triton X100	Sigma-Aldrich, München
Trypan Blau (0,1%)	Sigma-Aldrich, München
Tween20™	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

2.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Name	Firma
ChemiDoc Geldokumentationssystem	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Deckgläser	Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen
Elektrophorese-Kammer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektrophoresis Power Supply	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml oder 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Zentrifugen (5804 und 5415R)	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage (AG 204 Delta Range)	Mettler Toledo, Gießen
Filterpapier (whatman paper)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Heizblock (thermomixer compact)	Eppendorf, Hamburg
Inkubator (WTB Binder CB 210)	Binder GmbH, Tuttlingen
Laserscan-Mikroskop (CLSM 510-UV)	Zeiss, Oberkochen
Mikroplattenlesegerät Safire	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Mikroplattenlesegerät Spectrafluorplus	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Multikavitätenplatten (6-, 12- oder 96 Kavitäten)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
MyCycler (Thermocycler)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Nanodrop Spektrophotometer ND-1000	Nanodrop, Wilmington, USA
Objektträger, 8 Kavitäten (8-Well-und 4-Well Chambersslides)	BD Biosciences, San José, USA
Orbitalschüttler (Heidolph Unimax 1010)	Brinkmann Instruments, NY, USA
pH-Meter Toledo 320	Mettler Toledo, Gießen
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P/Immobilon-FL)	Millipore Corporation, Billerica, USA
Real-Time PCR Maschine	Stratagene, La Jolla, USA
Schüttler (Heidolph Unimax 1010)	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbäder (GFL Typ 1002 und 1004)	Milian Labware, USA
Western Blot-Kammer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Zellkulturbank (type S-2000 1.5)	Heto-Holten, Dänemark

Zellkulturflaschen, 175cm², 75cm²,
25cm²(CellStar tissue culture flask T175,
T75, T25)

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.1.6 Inhibitoren

Alle Inhibitoren wurden von der Firma Calbiochem aus Darmstadt bezogen.

Inhibitor	Funktion
Akt Inhibitor V	Akt
H-89	PKA
Manumycin	Ras
MDL-12	Adenylatzyklase
Sirtinol	Sirt1
Wortmannin	PI-3-Kinase

2.1.7 Medien, Lösungen, Puffer

Perfusions-Puffer für die Isolierung primärer Maushepatozyten:

Puffer I	8,3 g	NaCl
	0,5 g	KCl
	2,4 g	Hepes
	auf 1L	dH ₂ O
Puffer II	3,9 g	NaCl
	0,5 g	KCl
	0,7 g	CaCl ₂ *2H ₂ O
	24 g	Hepes
	auf 1L	dH ₂ O
	pH 7,6	einstellen

Puffer III	8,3 g	NaCl
	0,5 g	KCl
	0,18 g	CaCl ₂ *2H ₂ O
	2,4 g	Hepes
	auf 1L	dH ₂ O
	pH 7,4	einstellen

Phosphat-Puffer

- PBS 10 X Puffer:

80 g	NaCl
2 g	KCl
14,4 g	Na ₂ PO ₄
2,4 g	KH ₂ PO ₄
auf 1L	dH ₂ O
- D-PBS (GIBCO, 1X) Invitrogen, Karlsruhe
- PBS/EDTA Lonza, Verviers, Belgium
- PBST 0,1% (v/v) Tween20 in PBS

Western-Blot-Puffer

- SDS-Page Laufpuffer :

30,25 g Tris
144 g Glycin
100 ml SDS (10%)
auf 1 L dH ₂ O
- Transferpuffer:

3 g Tris
14,4 g Glycin
in 1 L dH ₂ O
vor Gebrauch versetzt mit 20% (v/v) Methanol
- Blockpuffer: I-Block 2 g I-Block in 1 L PBS

- Assay-Puffer: 10,6 g DEA
500 μ l $MgCl_2$
in 1 L dH_2O
- Entwicklungslösung: Nitroblock II., 1:200 in Assay-Puffer
CDP-Star, 1:1000 in Assay-Puffer

Polyacrylamidgele (für 4 Gele):

Reagenzien	Trenngel 8%	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Sammelgel
30% Polyacrylamid	10,8 ml	13,3 ml	15,5 ml	3 ml
1,8 mol/l Tris-HCl (pH 8,8)	8 ml	8 ml	8 ml	-
0,8 mol/l Tris-HCl (pH 6,8)	-	-	-	4 ml
dH_2O	20,6 ml	18,1 ml	15,9 ml	12,7 ml
SDS (10%)	400 μ l	400 μ l	400 μ l	200 μ l
APS (10%)	200 μ l	200 μ l	200 μ l	100 μ l
TEMED	8 μ l	8 μ l	8 μ l	4 μ l

Luziferase-Puffer:

- Z-Puffer: 40 mM β -Mercaptoethanol
10 mM KCl
1 mM $MgSO_4$
100 mM Na_3PO_4
in dH_2O
- Reporter-Lysepuffer 5X Promega, Mannheim

Lyse-Puffer:

- NP-40 Lysepuffer 1%(v/v) Igepal (NP-40)
 1,6 mM Protease-Inhibitor (PI)
 25 mM NaF
 1 mM Na₃VO₄
 in PBS

- Protein-Probenpuffer 2X 40 ml SDS (10%)
 10 ml Tris/HCl (1M, pH 6,8)
 10 ml β-Mercaptoethanol
 20 ml Glycerol
 0,2 mg Bromphenolblau

2.1.8 Kits

- cAMP -Assay Kit Firma R&D Systems (Wiesbaden)
- Caspase-3 Activity-Assay, Firma Biomol (Wien)
- CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Firma Promega (Mannheim)
- iScript cDNA Synthesis Kit, Firma Bio-Rad (München)
- IL-16 Quantikine ELISA Kit, Firma R&D Systems (Wiesbaden)
- Luciferase-Assay System, Firma Promega (Mannheim)
- Ras GTPase Chemi ELISA kit, Firma Active Motif (Carlsbad, CA)
- Rneasy Kit, Stratagene (USA)

2.1.9 Versuchstiere

Alle Tierexperimente wurden nach den neusten Richtlinien durchgeführt und waren von der Tierversuchskommission genehmigt. Für die Versuche wurden Balb/c Mäuse im Alter von 8-12 Wochen aus der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes-Gutenberg-Universität verwendet. Der Albino Mausstamm Balb/c wurde 1923 von McDowell durch Inzucht generiert und gehört zu den am meisten verwendeten Mausstämmen.

2.2 Methoden

2.2.1 Das ConA-Hepatitismodell

Die Induktion T-Zell-vermittelter Hepatitis durch das pflanzliche Lektin Concanavalin A ist bereits seit 1992 ein etabliertes Tiermodell (Tiegs et al.). 8-12 Wochen alten Balb/C Mäusen wurde intravenös in die Schwanzvene 25 µg ConA/g Körpergewicht und oder 7,5 U hCG/g Körpergewicht injiziert. Den Kontrolltieren wurde pyrogenfreie Kochsalzlösung gespritzt. Für die Injektion wurden die Tiere in eine Arretiervorrichtung geführt und der Schwanz mit Hilfe einer Rotlichtlampe erwärmt. Nach drei Stunden wurden die Tiere getötet und das Blut aus dem Herzen entnommen. Das Blut wurde für zwei Stunden in den Kühlschrank gestellt und anschließend das Serum durch Zentrifugation gewonnen. Die Bestimmung der Transaminasewerte Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) erfolgte mit dem standardisierten Blut-Analyse-Gerät Reflotron Plus. Die Lebergewebe der Mäuse wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

2.2.2 CD95-induzierter Leberschaden

Für dieses Experiment wurden ca. 12 Wochen alten Balb/C Mäusen intraperitoneal 10 µg pro 20 g Körpergewicht des anti-CD95-Antikörpers Jo-2 (Pharmingen) in 200 µl Phosphat-gepufferter Saline injiziert. Eine weitere Gruppe bekam zusätzlich 7,5 U hCG pro g Körpergewicht. Nach drei Stunden wurden die Transaminasewerte GOT und GPT mit Hilfe des Blut-Analyse-Gerätes „Reflotron Plus“ bestimmt und die Lebergewebe wurden bei -80°C aufbewahrt.

2.2.3 Das lacBSA-Modell

Der chronische Leberschaden wurde mit Hilfe von lactosylierten BSA induziert. Dafür wurden 8 Wochen alte Balb/C Mäuse verwendet und zweimal im Abstand von 6 Tagen mit Rinderserumalbumin sensibilisiert. Dies erfolgte subcutan in die Innenseite der Oberschenkel. Anschließend wurde den Mäusen einmal pro Woche 20 µg/g lac-BSA intraperitoneal injiziert. Eine Hälfte der Mäuse bekam zusätzlich 7,5 U hCG/g Körpergewicht gepulst. Nach 3,4, 6 und 8 Wochen wurden jeweils 5 Mäuse getötet und das Blut aus dem Herzen entnommen. Das Serum wurde gewonnen und die Transaminasewerte Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase mit dem standardisierten Blut-Analyse-Gerät Reflotron Plus bestimmt.

Für histologische Untersuchungen wurden das Lebergewebe in flüssigem Stickstoff schockgeroren und bei -80°C gelagert.

2.2.4 Isolierung primärer humaner Hepatozyten

Primäre humane Leberzellen wurden aus gesunden Lebergeweben isoliert. Diese stammten von Patienten, die sich aus verschiedenen Gründen, wie z.Bsp. einem Leberzellkarzinom oder einem Cholangiozellulären Karzinom, einer Leberhemihepatektomie unterziehen mussten. Das Leberstück wurde nach geeigneten Gefäßen untersucht und diese dann zuerst mit PBS/Heparin perfundiert, um das Blut zu entfernen. Anschließend wurden die Gefäße mit einer Preperfusionslösung für 45 min gespült bevor der Verdau mit der Collagenase-Lösung für 20-30 min erfolgte. Die unverdauten Bereiche des Leberstückes wurden entfernt und der verdaute Teil wurde vorsichtig mit einem Skalpell mehrmals durchtrennt, so dass die Zellen sich lösen konnten. Die Zellsuspension wurde durch eine Gaze gefiltert und dreimal mittels Zentrifugation gewaschen. Die Vitalitätsbestimmung der Zellen erfolgte mit Trypanblau. Die Hepatozyten wurden mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^5$ pro ml in Collagen-beschichtete Zellkulturplatten in Williams Medium mit 10 % FCS, 15 mmol/l HEPES (pH 7,4), 2 mmol/l Glutamin, 100 Units/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin ausgesät. Nach 16 Stunden wurde das Medium durch frisches Medium mit 5 % FCS ersetzt und bis zur Verwendung bei 37°C in 5% CO_2 inkubiert.

2.2.5 Isolierung primärer muriner Hepatozyten

Für die Isolierung der primären Hepatozyten wurden Balb/c Weibchen im Alter von 8-12 Wochen verwendet. Die Mäuse wurden mit einem Gemisch aus Rompun und Ketamin narkotisiert. Dafür wurden 3,4 mg Ketamin und 0,214 mg Rompun pro 20 g Körpergewicht eingesetzt. Anschließend erfolgte die Öffnung des Bauchraumes und durch die Vena Portae wurde Puffer I (HEPES-gepufferte Salzlösung mit 10 mM HEPES (pH 7.4), 67 mM NaCl, 6.7 mM KCl und 1.5 mM CaCl_2), der zuvor bei 37°C vorgewärmt wurde, mit Hilfe einer Kanüle und einer Pumpe gegeben. Die Perfusion wurde durch das Aufschneiden der Vena Cava gestartet und 50 ml von Puffer I wurden in einer Geschwindigkeit von 18-20 ml/min für die Perfusion verwendet. Daraufhin wurde die Leber mit 50 ml CollagenasePuffer II (100 mM HEPES (pH 7.6), 67 mM NaCl, 6.7 mM KCl, 6.0 mM CaCl_2 and 0.12 Units/ml Collagenase Typ NB 4G)

gespült. Die perfundierte Leber wurde entnommen und in eine Petrischale mit Puffer III (10 mM HEPES pH7.4, 6.7 mM KCl and 1.5 mM CaCl₂) überführt. Die Leberkapsel wurde entfernt und die Hepatozyten wurden vorsichtig herausgeschüttelt. Anschließend wurde die Zellsuspension durch eine Gaze filtriert und durch Zentrifugation bei 500 rpm die nicht parenchymalen Zellen von den Hepatozyten getrennt. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt, bevor die Zellen auf Collagen-beschichtete Platten in DMEM-Medium mit 10 % FCS, 20 mM HEPES Puffer, 2 mM L-Glutamin, 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin ausgesät werden konnten. Nachdem sich die Zellen am Boden angeheftet hatten, wurde das Medium gewechselt.

2.2.6 Transfektion von primären Hepatozyten

Die transiente Transfektion der Maushepatozyten erfolgte mit der Lipofektionsreagenz TransFectin gemäß der Anleitung der Firma (Bio-Rad). Dieses Verfahren beruht auf der Komplexbildung der DNA an der Oberfläche kationischer Lipidvesikel, die dann von den Zielzellen aufgenommen werden. Für die Transfektion wurden die Zellen in 12-Kavitätenplatten ausgesät und pro Kavität wurde 1 µg DNA eingesetzt. Folgende Plasmide wurden verwendet: FHRE-Luc-, Sirt1-, Foxo3a Wildtyp- und mutierte Foxo3a-Plasmide (Tran et al. 2002, Brunet et al. 1999 und Brunet et al. 2004). Als Transfektionskontrolle diente β-Galaktosidase, welches in einer Konzentration von 50 ng pro Kavität verwendet wurde. Für die Negativkontrolle wurde der leere Vektor pGL3 verwendet. Die DNA wurde in 100 µl Medium aufgenommen und pro 1 µg DNA wurden 2 µl Transfektionsreagenz in ebenfalls 100 µl Medium verdünnt. Die beiden Ansätze wurden zusammengeführt, vorsichtig invertiert und für 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor die Transfektionslösung vorsichtig auf die Zellen gegeben wurden. Nach 4-6 Stunden wurde das gleiche Volumen an Medium zugegeben.

2.2.7 Luziferase-Reporter-Assay

Die transfizierten Zellen wurden mit 200 U/ml hCG für eine Stunde behandelt und anschließend erfolgte die Induktion mit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) für eine weitere Stunde. Daraufhin wurde der Luziferase-Assay mit Hilfe des Luziferase-Assay-Systems von Promega durchgeführt. Dieser Assay beruht darauf, dass die Plasmide, außer dem zu untersuchenden Gen, zusätzlich nachgeschaltet das Reportegen

Luziferase besitzen. Luziferase ist ein Enzym, welches in der Gegenwart von O_2 , ATP und Mg^{2+} die Umwandlung in Oxyluziferin AMP, PP_i , H_2O_2 , sowie CO_2 katalysiert. Dabei emittiert Licht in einer Wellenlänge von 562 nm. Durch die Zugabe des Substrates Luziferin kann die Aktivität des Promotors durch die Intensität der Emission ermittelt werden. Die Transfektionseffizienz wurde anhand der Aktivität der β -Galktosidase normalisiert und die Luziferase-Aktivität ist dargestellt als n-fache Expression über dem pGL3 Basisvektor.

2.2.8 Apoptose- und Zellvitalitätsassay

Für diesen Versuch wurden murine und humane Hepatozyten in Kollagenbeschichtete 96 well Platten in einer Dichte von 8000 Zellen pro Kavität ausgesät. Nachdem sich die Zellen am Boden angeheftet hatten, wurden die humanen Hepatozyten mit 200 ng/ml des agonistischen CD95-Antikörpers anti-APO-1 für 4-6 Stunden und die murinen Hepatozyten mit 200 ng/ml Jo-2 für 16-24 Stunden behandelt, um Apoptose zu induzieren. Zusätzlich wurden die humanen Zellen mit 100 U/ml hCG und die murinen Hepatozyten mit 200 u/ml hCG behandelt. Nachdem die typischen morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen auftraten, wurde die Anzahl lebender Zellen mit dem „Cell-Titer Glo Luminescent Viability Assay“ (Promega) bestimmt. Der Test beruht darauf, dass metabolisch aktive Zellen ATP produzieren, welches direkt proportional zur Anzahl an lebenden Zellen ist. In Gegenwart von ATP wird die im Kit enthaltene thermostabile Luziferase und deren Substrat Luziferin in Sauerstoff und Mg^{2+} -Ionen mit Hilfe des Enzyms Oxyluziferin, AMP, PP_i , H_2O_2 und CO_2 umgewandelt. Der Assay wurde genau nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und die Zellvitalität wurde als „relative Lumineszenz units“ (RLU) dargestellt.

2.2.9 Caspase-3-Aktivitäts-Assay

Caspase-3 ist ein Schlüsselenzym in der Apoptosekaskade. Für den Nachweis der Caspase-3 Aktivität in primären Hepatozyten nach Apoptoseinduktion und hCG-Behandlung wurde der kolorimetrische Test von Biomol verwendet. Dazu wurden primäre humane Hepatozyten mit 200 ng/ml des antagonistischen Antikörpers anti-APO-1 und oder mit 100 U/ml hCG für 3 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Aktivität von Caspase-3 gemessen. Der Test beruht darauf, dass das im Kit

enthaltene Substrat DEVD-AFC von Caspase-3 gespalten wird, wodurch AFC gelb-grünes Licht emittiert. Dieses wird im Spektralphotometer bei 505 nm quantifiziert.

2.2.10 Ras-Aktivitäts-Assay

Das Protein Ras ist ein Proto-Onkogen, welches eine wichtige Rolle in vielen zellulären Prozessen wie Apoptose, Zellteilung und Differenzierung spielt. Für die Bestimmung der Ras-Aktivität nach hCG-Behandlung wurden primäre murine- und humane Hepatozyten in Kollagen-beschichtete Petrischalen ausgesät. Für jeden Ansatz wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen verwendet und mit 100 U/ml (human) bzw. 200 U/ml (murin) für 30 min behandelt. Die Ras-Aktivität wurde mittels des Ras GTPase Chemi ELISA Kits nach Anleitung des Herstellers Active Motif bestimmt.

2.2.11 Adenosine 3', 5'-syclic Monophosphat (cAMP) Assay

Für die Quantifizierung des cAMP-Gehaltes in hCG-behandelten und unbehandelten Zellen wurde der cAMP-Assay von R&D Systems gemäß der Anleitung verwendet. Dafür wurden primäre Maushepatozyten auf Kollagen-beschichtete Petrischalen ausgesät und nach 16 Stunden mit 200 U/ml hCG behandelt. Für jeden Ansatz wurden $1 \cdot 10^6$ genommen. Der Standard wurde in Duplikaten und die Proben in Quadruplikaten gemessen. Anhand der Standard-Kurve konnte die cAMP-Konzentration in den behandelten Zellen ermittelt werden.

2.2.12 Zytotoxischer T-Zell-Assay

Um herauszufinden, ob hCG die Zytotoxizität von T-Zellen beeinflusst, wurde ein zytotoxischer T-Zell Assay durchgeführt. Dazu wurde eine HLA.A*0201-restringierte zytotoxische T-Zell-Linie (CTL) verwendet, die spezifisch für das humane Wildtyp Peptid p53.264-272 ist. Der Ursprung und die Kultivierung dieser Zelllinie wurden bereits 1995 beschrieben (Theobald et al.). Des Weiteren wurden für die Kokulturrexperimente humane HLA.A*0201-positive Hepatozyten isoliert und mit ^{51}Cr gelabelt. Außerdem wurden sie mit dem p53.264-272 Peptid beladen und teilweise mit 100 U/ml hCG behandelt. Als Effektorzellen dienten die HLA.A*0201-restringierten CTLs, und sie wurden in verschiedenen Verhältnissen zu den Zielzellen gegeben (10:1, 3:1, 1:1, 0,3:1 und 0,1:1). Nach 4-5 Stunden Kokultivierung wurde die Abgabe von ^{51}Cr gemessen. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einem

Peptid beladen wurden, welches von den CTLs nicht erkannt werden konnte, und somit wurden die Zellen auch nicht lysiert.

2.2.13 Chemotaxis-Assay

Unter Chemotaxis versteht man die gerichtete Migration von Zellen entlang eines Gradienten einer chemotaktischen Substanz, in diesem Versuch IL-16. Dafür wurden humane und murine CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe der Kits von Miltenyi („human CD4⁺ T cell isolation kit II“ und „mouse human CD4⁺ T cell isolation kit II“) isoliert. Die Separation der Zellen erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die humanen CD4⁺ T-Zellen wurden aus Buffy Coats gesunder Spender der Transfusionszentrale in der Universitätsmedizin Mainz und die murinen CD4⁺ T-Zellen aus der Milz gewonnen. Außerdem wurden die Überstände von humanen und murinen Hepatozyten, die zuvor mit 200 ng/ml anti-APO-1 und mit 200 U/ml hCG behandelt wurden, verwendet. Zur Kontrolle, ob die Anlockung der CD4⁺ T-Zellen auf IL-16 zurückzuführen ist, diente der neutralisierende IL-16 Antikörper von Abcam. Für den Test wurden Transwell-Kammern mit 24 wells verwendet. Die Transwell-Kammern bestehen aus einer oberen und einer unteren Kammer, die durch eine Membran mit einer Porengröße von 3 µm getrennt sind. In die untere Kammer befanden sich behandelten Hepatozyten und in der oberen Kammer 1*10⁶ CD4⁺ T-Zellen. Nach 3 Stunden Inkubation wurden die T-Zellen in der unteren Kammer von drei verschiedenen Personen gezählt.

2.2.14 Zytokin-Array

Für die Analyse des Zytokin-Profiles der Seren des ConA- und lac-BSA Versuchs (siehe 2.2.1 und 2.2.2) wurde der „Mouse Cytokine Array Panel A“ von R&D Systems gemäß den Herstellerangaben verwendet. Es wurden jeweils fünf Seren von unbehandelten und hCG-behandelten Mäusen gepoolt und mit einem Cocktail von biotinylierten Detektionsantikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Seren auf die Nitrozellulose-Membran mit den verschiedenen „Capture“-Antikörpern gegeben und über Nacht inkubiert. Jeder vorhandene Zytokin/Detektionsantikörper Komplex bindet so an seinen immobilisierten „Capture“-Antikörper auf der Membran. Anschließend wurde die Membran gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen. Die Detektion erfolgte mit Streptavidin-HRP und chemilumineszierenden Detektions-

Reagenzien. Jeder Spot auf der Membran produzierte Licht proportional zu der Menge an gebundenen Zytokinen.

2.2.15 Western Blot

Herstellung der Proteinextrakte

Für die Analyse der Proteinexpression in Gesamtzellextrakten wurden $1 \cdot 10^6$ Hepatozyten und $5 \cdot 10^6$ CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und Monozyten verwendet. Die zu untersuchenden Zellen wurden nach Behandlung mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1 % NP40 in PBS 10 Minuten auf Eis lysiert. Nach zweiminütigem Schütteln wurden die Lysate 5 min bei 99 °C denaturiert und mit 2 x Probenpuffer 1:1 versetzt. Anschließend wurden die Extrakte in die Geltaschen pipettiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Diese Methode wird verwendet, um Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu trennen. Für die Western Blots wurden 8-, 10-, und 12 % Tris-Glycin-Gele verwendet und die Proteine bei einer konstanten Spannung von 130 V für 90 Minuten aufgetrennt. Als Protein-Größenmarker diente der Page Ruler Prestained Protein Ladder von Fermentas und die Chemikalien für die Herstellung der Gele sowie die verwendeten Puffer sind unter 2.1.7 beschrieben.

Western Blot

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert, um anschließend mit verschiedenen Antikörpern die zu untersuchenden Proteine zu detektieren. Dazu wurde die Tankblot-Methode gewählt, bei der der Transfer der Proteine in einem Puffertank zwischen Elektroden an den Seitenwänden erfolgt. Durch eine Kühleinheit im Tank wurde während der Übertragung eine homogene Temperatur erreicht, wodurch die Ausbildung eines Ionengradienten verhindert wird. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 30 mA für 90 Minuten. Anschließend wurde die Membran für 30 Minuten in eine Blocklösung gelegt, bevor die Zugabe des Erstantikörpers (Verdünnung in Blocklösung, siehe 2.1.1) über Nacht bei 4 °C erfolgte. Die Membran wurde dreimal mit PBS/Tween für jeweils 5 min gewaschen und der Zweitantikörper gekoppelt mit alkalischer Phosphatase für 2 Stunden auf die Membran gegeben. Daraufhin wurde die

Membran erneut dreimal mit PBS/Tween gewaschen. Für die Detektion der Proteine wurde die Membran zweimal für 10 Minuten in Assay-Puffer inkubiert bevor die in Assay-Puffer verdünnte (1:200) Signalverstärkungslösung Nitroblock II für 10 Minuten zugegeben wurde. Als Substrat für die alkalische Phosphatase wurde CDP-Star (1:1000 in Assay-Puffer) für 5 min mit der Membran inkubiert und die Entwicklung der Chemilumineszenz wurde im Chemidoc XRS-Gerät von Bio-rad dokumentiert.

2.2.16 Immunpräzipitation

Um die Acetylierung von Foxo3a nach hCG Behandlung zu analysieren wurde eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Diese Methode eignet sich dazu mittels eines Antikörpers ein Antigen in einer Lösung aufzukonzentrieren. Dies ist in diesem Versuch wichtig, da der später für den Western Blot verwendete acetylierte Lysin Antikörper nur an Foxo3a binden soll.

Für die IP wurden primäre humane Hepatozyten isoliert (siehe 2.2.4) und $5 \cdot 10^6$ Zellen in eine Petrischale mit 10 cm Durchmesser ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Accutase gelöst und in zwei 15 ml Falcon Röhren gegeben. Eine Zellsuspension wurde für 90 min mit 100 U/ml hCG behandelt. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert und in RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) Puffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1% NP40, Natriumfluorid 1:50, Protease Inhibitor 1:25 und Orthovanadat 1:200) lysiert. Die Zellen wurden für 15 min auf Eis lysiert, gevortext und bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:1 mit RIPA Puffer ohne NP40 verdünnt und die Agarose A Beads, die den Protein-Antikörper Komplex präzipitieren sollen, zweimal mit RIPA Puffer gewaschen bevor das Lysat zu den Beads gegeben wurde. Daraufhin wurde der Foxo3a Antikörper dazugegeben und die Proben über Nacht bei 4°C auf dem Probenrad inkubiert. Die Beads wurden erneut zweimal mit RIPA Puffer gewaschen, der Überstand abgenommen und 50 µl 2 fach Probenpuffer zu den Beads gegeben und bei 95°C für 5 min erhitzt, bevor das Immunpräzipitat im Western Blot untersucht wurde. Die Detektion erfolgte mit dem acetylierten Lysin Antikörper.

2.2.17 Inhibitor-Studien

Für die Untersuchung des hCG-Signalweges wurden verschiedene Inhibitoren in Zellvitalitätsassays verwendet. Dazu wurden in Collagen-beschichtete 96-Kavitätenplatten 8000 humane und murine Hepatozyten pro Kavität ausgesät. Nachdem sich die Zellen am Boden festgesetzt hatten, wurden sie mit den Inhibitoren MDL-12 (Adenylatzyklase), H-89 (Proteinkinase A), Manumycin (Ras), Wortmannin (PI3-Kinase) und Sirtinol (Sirt 1) für eine Stunde behandelt. Anschließend wurden 100 U/ml hCG zu den humanen Zellen und 200 U/ml zu den murinen gegeben und mit den agonistischen CD95-Antikörpern anti-APO-1 und Jo-2 Apoptose induziert. Die Vitalität der Zellen wurde mit dem „Cell-Titer Glo Luminescent Viability Assay“ von Promega bestimmt.

2.2.18 IL-16 ELISA

Für die Bestimmung der IL-16 Konzentration in primären humanen Hepatozyten und in Seren von Patienten, die an autoimmuner Hepatitis erkrankt sind, wurde das humane IL-16 Quantikine ELISA Kit von R&D Systems herangezogen. Die humanen Hepatozyten wurden für 3 Stunden mit dem agonistischen Antikörper anti-APO-1 und mit 100 U/ml hCG behandelt. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und der ELISA gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Der Standard wurde in Duplikaten und die Proben in Triplikaten gemessen.

2.2.19 Immunfluoreszenzfärbung

Mit Hilfe dieser Methode können Proteine in der Zelle mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Des Weiteren wird zusätzlich der Zellkern angefärbt, um eine Aussage über die Lokalisation der Proteine machen zu können. In dieser Arbeit wurde die indirekte Immunfluoreszenzfärbung angewandt, bei der ein unmarkierter Primärantikörper an das Antigen bindet und erst im nächsten Schritt ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper eingesetzt wird.

Primäre Maushepatozyten wurden in 8-well-Chamber-Slides ausgesät und mit den Foxo3a-Konstrukten HA-WTER, HA-TM-ER und HA-TM Δ DB-ER transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit Transfectin von BioRad (siehe 2.2.6) und 1 μ g DNA pro well. Nach 48 Stunden erfolgte die Behandlung mit 200 U/ml hCG und mit 4-Hydroxytamoxifen für eine Stunde. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen,

mit 4%iger Paraformaldehydlösung für 20 min bei Raumtemperatur fixiert, nochmals mit PBS gewaschen und bis zur Färbung bei 4°C aufbewahrt. Für die Färbung wurden die Zellen für 15 min mit Saponin (0,2% in PBS) permeabilisiert und anschließend für mindestens 30 min in Blocklösung (3% BSA und 0,1% Triton X-100 in PBS) inkubiert. Danach wurde das Hemagglutinin-Epitop mit einem HA-Antikörper angefärbt, indem zunächst für eine Stunde der Primärantikörper (1:100) in Blocklösung und nach dreimaligem Waschen der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (1:200) auf die Zellen gegeben wurde. Gleichzeitig mit der Sekundärantikörperlösung wurde der Zellkern mit Höchst 33342 angefärbt. Dieser Schritt wurde im Dunkeln durchgeführt. Nachdem die Zellen dreimal für 5 min mit PBS/Tween und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen wurden, konnten sie mit Eindeckmedium (Permafluor) und einem Deckgläschen eingebettet werden.

Die Immunfluoreszenzfärbungen mit Sirt1, pSirt1, IL-16 und dem LH/CG Rezeptor wurden ebenfalls nach diesem Protokoll durchgeführt (Konzentration siehe 2.1.1).

2.2.20 RT-PCR

Die PCR ist eine Methode, um einen bestimmten DNA-Abschnitt zu vervielfältigen. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene PCR-Methoden angewandt: die Semi-quantitative PCR und die quantitative Real-Time-PCR. Der Vorteil der quantitativen Real-Time-PCR ist die Möglichkeit der Quantifizierung der gewonnenen DNA mittels Fluoreszenzmessungen während der PCR-Zyklen. Beide Methoden erfordern zuerst die RNA-Isolierung aus Zellen oder Gewebe und anschließend eine cDNA-Synthese. Die verwendeten Primer sind unter 2.1.3 aufgelistet.

RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte aus den behandelten Zellen mit Hilfe des Rneasy Kits von Stratagene gemäß den Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden nach der Behandlung mit Accutase vom Boden der Petrischalen abgelöst, zweimal mit PBS gewaschen und in Lysepuffer mit β -Mercaptoethanol lysiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension auf einen Filter gegeben, zentrifugiert und das gleiche Volumen an 70 % Ethanol zum Eluat gegeben. 700 μ l der Suspension wurden auf eine RNA-bindende Säule gegeben und 30 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Säule gewaschen, bevor sie zwei min durch Zentrifugation getrocknet und 50 μ l der Lösung für den DNA-Verdau auf die Säule

gegeben wurde. Der Verdau dauerte 15 min bei 37°C. Anschließend wurde die Säule zweimal gewaschen und die RNA mit 30 µl Elutionspuffer in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß eluiert. Die RNA wurde bei – 80°C aufbewahrt.

cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA wurde unter Verwendung des iScript cDNA Synthese Kits von Biorad (München) mittels reverser Transkription nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Reaktion wurde 1 µg RNA eingesetzt. Die Analyse der RNA erfolgte über den Quotienten der oD bei 260 nm und der oD bei 280 nm. Das Ergebnis gibt Auskunft über die Reinheit der RNA und sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Das Reaktionsgemisch wurde 5 min bei Raumtemperatur, 45 min bei 42°C und 5 min bei 85°C inkubiert.

Semiquantitative PCR

Für die PCR wurden 1 µl cDNA eingesetzt und das Taq PCR core Kit von Quiagen gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Jede Reaktion wurde über 30 Zyklen in einem Volumen von 25 µl im Thermocycler von Biorad durchgeführt. Als Ladekontrolle diente das Haushaltsgen RNA Polymerase II (RpII). Für die Agarosegelelektrophorese wurde ein 1% Agarosegel versetzt mit Ethidiumbromid verwendet und 10 µl des Reaktionsansatzes in jede Tasche pipettiert.

Quantitative Real-Time-PCR

Die Quantifizierung der DNA erfolgte mit dem Stratagene Mx 3000P PCR System durch Fluoreszenz-Messungen während der PCR Zyklen. Für die Reaktionsansätze wurden 2 µl cDNA, 100 nM Primer und der 2x QPCR Syber green Mix von Abgene (Hamburg) verwendet. Als Referenzfarbstoff diente Rox und als Referenzgen RpII. Für die Quantifizierung musste eine Messung am Anfang der exponentiellen Phase erfolgen. Dazu wurde er Ct-Wert ermittelt, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz zum ersten Mal über das Hintergrund-Niveau hinaus ansteigt. Für die PCR wurden 40 Zyklen gewählt und alle Reaktionen in Triplikaten durchgeführt.

2.2.21 Liver histology and terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL)

Diese Methode dient dem Nachweis apoptotischer Zellen. Dabei werden die 3'-OH-Enden der degradierten DNA mit Fluorescin-gekoppelten dUTP markiert. Als Katalysator dient die terminale Desoxynukleotidyl-Transferase. Für die Färbung wurde das TUNEL Kit von Roche gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet. Das Lebergewebe der behandelten und unbehandelten Mäuse wurde in 4 % Paraformaldehyd fixiert und Kryoschnitte einer Dicke von 4 µM hergestellt. Die Schnitte wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Schnitte wurden rehydriert und in 0,1% Triton X-100/0,1% Natriumcitrat für 8 min permeabilisiert. Anschließend wurden die Schnitte in der TUNEL-Lösung für 60 min bei 37°C inkubiert und in PBS gewaschen. Die Zellkerne wurden mit Höchst gefärbt. Die Schnitte wurden mit Eindeckmedium und einem Deckgläschen eingebettet und unter dem konfokalen Laserscanmikroskop der Firma Zeiss analysiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Wirkung von hCG in Leberschädigungsmodellen der Maus

Für die Untersuchung, ob hCG Leberschädigung hemmen kann, wurden drei verschiedene Mausmodelle herangezogen, zwei mit akutem Leberversagen und ein Modell mit chronischem Leberschaden. Das Leberversagen in den akuten Mausmodellen wurde durch die intravenöse Gabe von Concanavalin A oder dem agonistischen CD95-Antikörper Jo-2 induziert. Der chronische Leberschaden war die Folge der Immunisierung von Mäusen mit Rinderserumalbumin (BSA) und anschließend einer wöchentlichen Injektion von lactosyliertem BSA.

3.1.1 Effekt von hCG im akuten ConA-Modell

Die intravenöse Gabe des Lektins Concanavalin A induziert eine akute, T-Zell-abhängige Hepatitis (Tiegs et al., 1992). Der Leberschaden wird hauptsächlich durch die TNF- α /TNFRI und CD95/CD95L-vermittelte Apoptose der Hepatozyten verursacht (Mizuhara H. et al., 1994 und Tagawa Y. et al., 1998). Den Mäusen wurde intravenös 25 μ g ConA/ g Körpergewicht bzw. ConA und 7,5 U hCG/ g Körpergewicht gespritzt. Den Kontrolltieren wurde Kochsalzlösung verabreicht. Nach drei Stunden wurden die Tiere getötet und das Blut aus dem Herzen entnommen. Die Bestimmung der Transaminasewerte Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) erfolgte mit dem standardisierten Blut-Analyse-Gerät Reflotron Plus. Beide Enzyme sind in hohen Konzentrationen in der Leber zu finden, wobei GPT vorwiegend in der Leber und GOT sowohl in der Leber als auch in der Muskulatur vorkommt. Die Bestimmung dieser Enzyme ist sehr wichtig für die Diagnose und klinische Beurteilung von Lebererkrankungen.

Die Messung zeigte, dass die Transaminasewerte GPT und GOT nach ConA Injektion (Abb. 10 a und b) stark anstiegen (GPT: 1264 IU/L und GOT: 3647 IU/L), wohingegen die Mäuse, die zusätzlich mit hCG behandelt wurden, signifikant niedrigere Werte im Serum aufwiesen (GPT: 274 IU/L und GOT: 1099 IU/L). Die GPT-Werte konnten durch hCG um fast das Fünffache und die GOT-Werte um mehr als das Dreifache reduziert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass hCG Mäuse vor akutem Leberschaden effizient schützen kann.

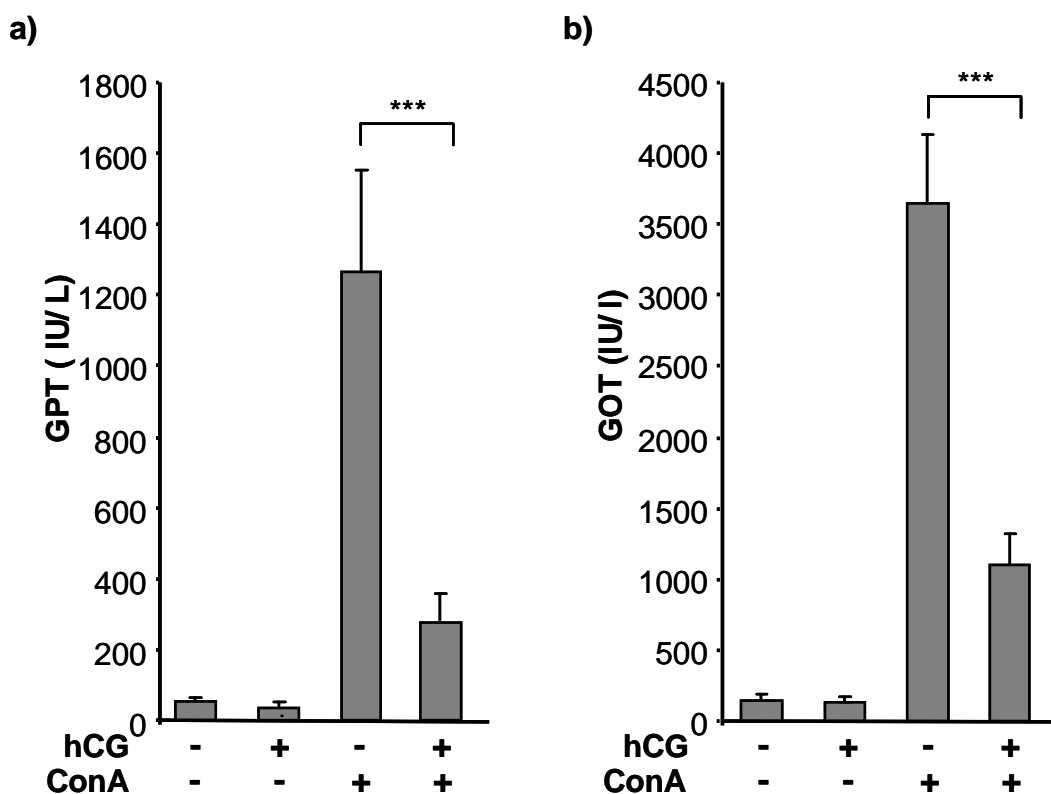


Abb. 10 hCG schützt Mäuse vor akutem Leberversagen induziert durch ConA.

Den Mäusen wurde intravenös ConA und hCG sowie als Kontrolle Kochsalzlösung gespritzt. Drei Stunden nach Injektion wurden die Mäuse getötet und die Transaminasewerte GPT (a) und GOT (b) im Blut bestimmt. Die Anzahl an Mäusen für jede Behandlung betrug n=5 (Mittelwerte \pm SD). Signifikanzniveau: ***, $P < 0,001$

3.1.2 Einfluss von hCG auf akuten Leberschaden nach Apoptoseinduktion

Ein weiteres Modell-System für akutes Leberversagen in Mäusen ist die intraperitoneale Injektion des agonistischen CD95-Antikörpers Jo-2. Die Leber ist gegenüber CD95-induzierter Apoptose extrem sensitiv, da das CD95-Antigen konstitutiv auf Hepatozyten exprimiert wird (Ogasawara et al., 1993). Die Mäuse wurden für 3 Stunden mit 10 μ g pro 20 g Körpergewicht Jo-2 und 7,5 U/ml pro g Körpergewicht hCG behandelt. Anschließend wurden sie betäubt und das Blut mittels Herzpunktion entnommen, um die Transaminasewerte GOT und GPT zu bestimmen. Es kam zu einem drastischen Anstieg der Transaminasewerte, wobei die GPT-Werte der Tiere, die nur mit Jo-2 behandelt wurden, im Durchschnitt bei 2368 IU/L (Abb. 11 a) und die GOT-Werte bei 2490 IU/L (Abb. 11 b) lagen. Die zusätzliche Behandlung mit hCG jedoch reduzierte die Transaminasewerte signifikant auf 1186 IU/L (GPT) und 1475 IU/L (GOT). Die Kontrolltiere, die nur mit hCG oder Kochsalzlösung behandelt wurden, wiesen keine erhöhten Leberwerte auf.

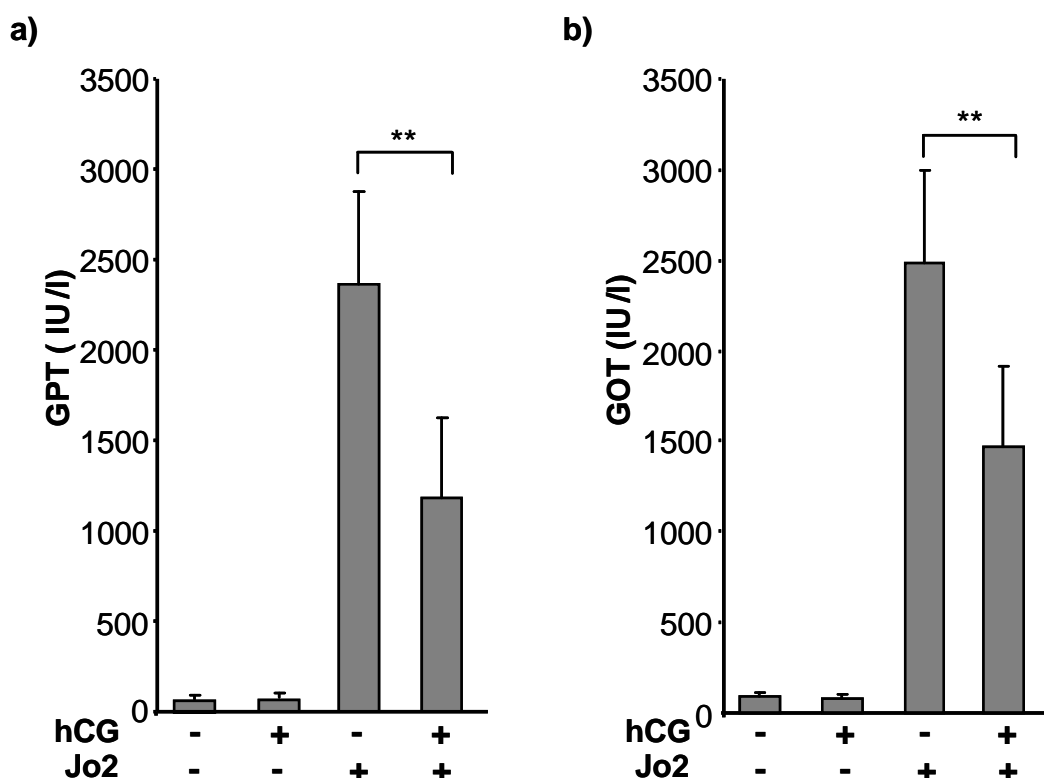


Abb. 11 hCG schützt Mäuse vor akutem Leberversagen induziert durch den agonistischen CD95-Antikörper Jo-2

Den Mäusen wurde intraperitoneal Jo-2 und oder hCG sowie Kochsalzlösung als Kontrolle injiziert und nach drei Stunden wurden die Transaminasewerte GPT und GOT bestimmt. Die Anzahl an Mäusen für jede Behandlung betrug n=5 (Mittelwerte \pm SD). Signifikanzniveau: **, $P < 0,01$

3.1.3 Untersuchung der hCG-Wirkung bei lacBSA-induzierter chronischer Hepatitis

Nachdem gezeigt werden konnte, dass hCG einen effektiven Schutz vor akutem Leberversagen bietet, sollte getestet werden, ob die Gabe von hCG auch für Mäuse mit chronischem Leberschaden therapeutisch von Bedeutung ist. Dazu wurde ein neues Model für autoimmune Hepatitis etabliert, welches darauf beruht, dass nur Hepatozyten den Asialoglykoproteinrezeptor besitzen. Dieser zellspezifische Rezeptor vermittelt die Aufnahme glykosylierter Proteine und kann deshalb zur gezielten Aufnahme lactosylierter Proteine genutzt werden.

Um eine Grundimmunisierung gegen Rinderserumalbumin zu erreichen wurden Mäuse zweimal im Abstand von sechs Tagen mit BSA immunisiert. Danach wurden die Tiere einmal pro Woche mit lacBSA behandelt und somit der Leberschaden durch eine T-Zell-abhängige Immunantwort auf lacBSA induziert. Nachdem die

Mäuse über einen Zeitraum von vier Wochen hohe GPT-Werte aufwiesen begann die Behandlung mit hCG einmal in der Woche. Als Kontrolle wurde Mäusen nur Kochsalzlösung bzw. nur hCG gespritzt. Jeweils fünf Mäuse pro Gruppe wurden nach sechs und acht Wochen Behandlung getötet und die GPT-Werte bestimmt. Es zeigte sich eine deutliche Verbesserung der GPT-Werte in der Gruppe hCG-behandelter Tiere, die bei 121 IU/L lagen, im Vergleich zu den Mäusen, die nur mit lacBSA behandelt wurden und Werte im Durchschnitt von 150 IU/L aufwiesen. Nach acht Wochen gelang die Senkung der GPT-Werte um die Hälfte (Abb. 12 a) von durchschnittlichen GPT-Werten von 210 auf 108 IU/L ($P < 0,001$). In Abbildung 12 b sind die GOT-Werte exemplarisch nach 8 Wochen Behandlung dargestellt. Auch hier kam es zu einer Senkung in hCG-behandelten Tieren.

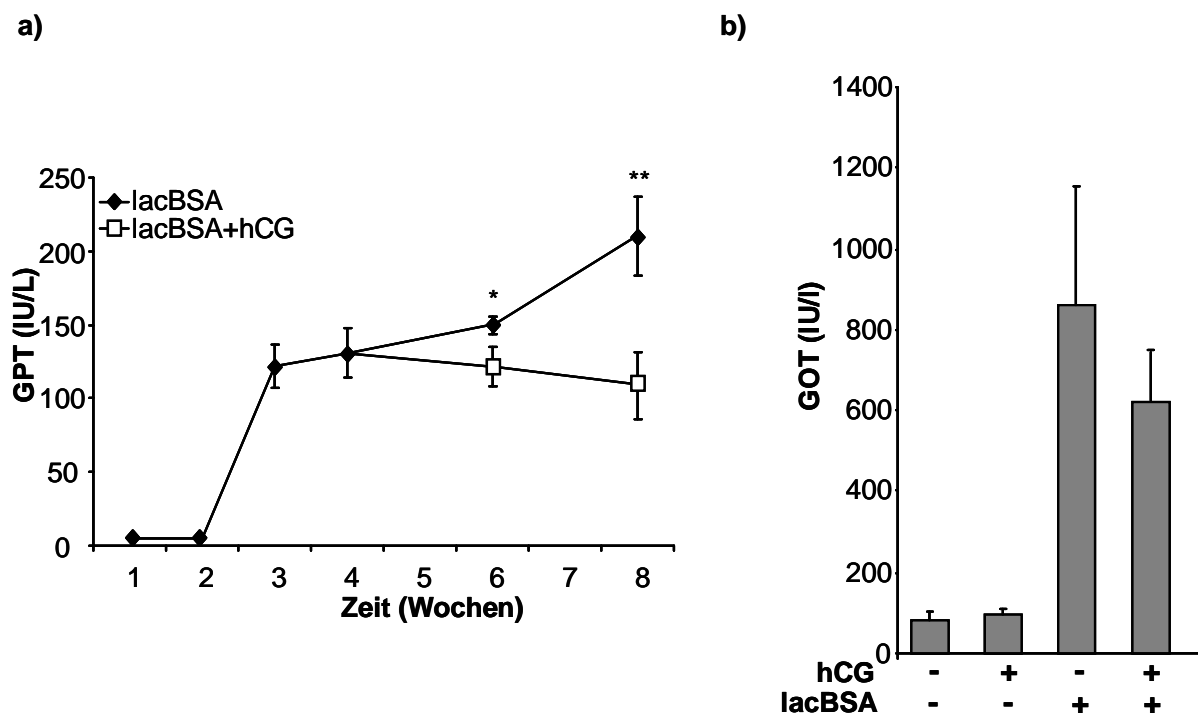


Abb. 12 hCG schützt Mäuse vor chronischer Leberentzündung induziert durch die Gabe von lacBSA

Die Mäuse wurden zweimal mit BSA immunisiert, bevor dann einmal wöchentlich lacBSA, hCG und als Kontrolle Kochsalzlösung injiziert wurde. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Mäuse getötet und das Serum für die Bestimmung des Transaminasewertes GPT verwendet. In Abb 3 b sind die GOT-Werte exemplarisch für den Zeitpunkt nach 8 Wochen dargestellt. Die Anzahl an Mäusen für jede Behandlung betrug $n=5$ (Mittelwerte \pm SD). Signifikanzniveau: *, $P < 0,05$ und **, $P < 0,01$

3.1.4 Mikroskopische Analyse der Lebergewebe

Das Lebergewebe der Mäuse mit akutem und chronischem Leberschaden (3.1.1 – 3.1.3) wurde immunhistologisch untersucht. Die apoptotischen Zellen wurden mit der TUNEL-Methode grün und die CD4⁺ T-Zellen mit einem anti-CD4 Antikörper rot gefärbt. Die Leber ConA-behandelter Tiere wies eine Vielzahl apoptotischer Zellen und eingewanderter CD4⁺ T-Zellen auf. In den hCG behandelten Tieren hingegen waren kaum TUNEL-positive oder CD4⁺ T-Zellen nachzuweisen.

In dem Lebergewebe der Mäuse, die mit lacBSA behandelt wurden, waren ebenfalls viele apoptotische Zellen in Verbindung mit CD4⁺ T-Zellen vorhanden und auch hier führte die Behandlung mit hCG zu einer drastischen Reduktion apoptotischer Zellen. Außerdem verhinderte hCG das Einwandern von CD4⁺ T-Zellen.

Das Lebergewebe der Mäuse, die mit dem agonistischen CD95 Antikörper Jo-2 behandelt wurden, zeigte ebenso eine große Anzahl an TUNEL positiven Zellen sowie eingewanderter CD4⁺ T-Zellen. Die zusätzliche Gabe von hCG führte zu einer verringerten Infiltration von CD4⁺ T-Zellen und zu einer Hemmung der Apoptose in der Leber.

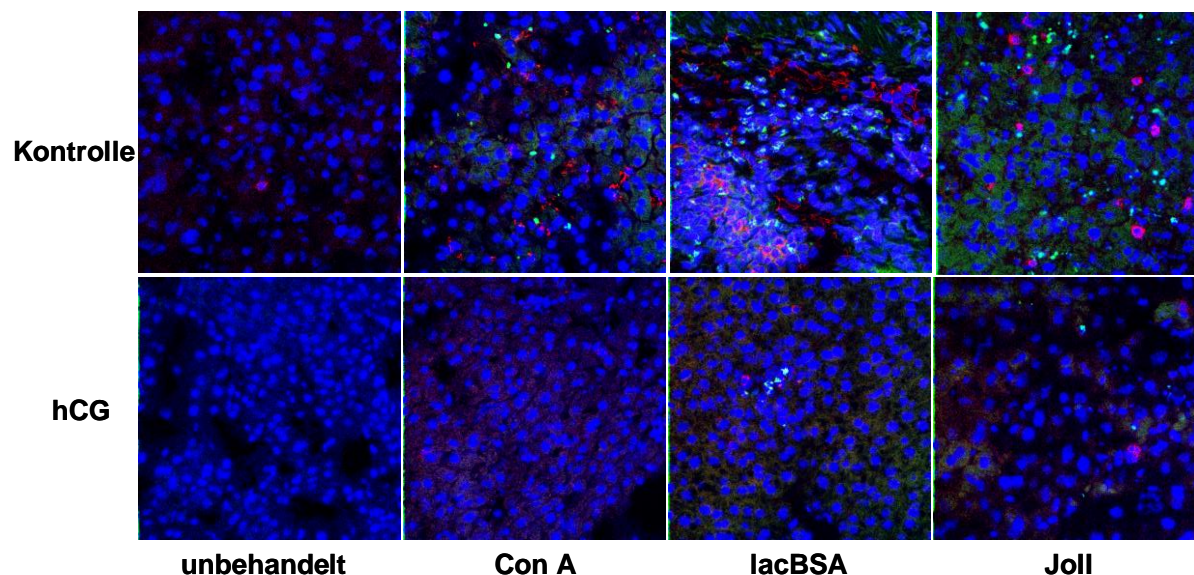


Abb. 13 hCG reduziert die Anzahl an apoptotischen Zellen und verhindert die Infiltration von CD4⁺ T-Zellen in die Leber

Von den Mauslebern aus Versuch 3.1.1-3.1.3 wurden Kryoschnitte hergestellt und die apoptotischen Zellen mittels der TUNEL-Methode (grün) untersucht. Die CD4⁺ T-Zellen sind rot gefärbt.

3.2 Analyse der hCG-Wirkung auf primäre Hepatozyten

Um die zelluläre Wirkung von hCG näher zu charakterisieren und seine Signalwege zu untersuchen wurden frisch isolierte Maushepatozyten und humane Hepatozyten aus Leberteilresektionen verwendet.

3.2.1 Expression des LH/CG Rezeptors

Bevor eine Behandlung der Zellen mit hCG erfolgen konnte, musste überprüft werden, ob primäre humane Hepatozyten den LH/CG-Rezeptor überhaupt exprimieren. Dazu wurde die RNA von vier verschiedenen Leberpräparationen isoliert und mit Hilfe von RT-PCR-Analysen die Expression der LH/CG Rezeptor mRNA untersucht. Es konnte in allen vier humanen Proben mRNA nachgewiesen werden (Abb. 14 a). Weiterhin konnte auch durch Immunfluoreszenzfärbung das Vorhandensein des LH/CG Rezeptorproteins in humanen Hepatozyten bewiesen werden (Abb. 14 b).

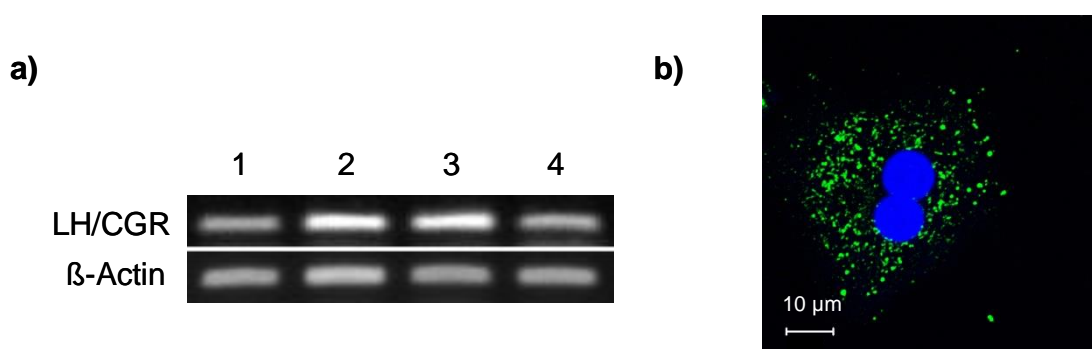


Abb. 14 Expression des LH/CG-Rezeptors in primären humanen Hepatozyten

(a) Aus Gewebe von Leberteilresektionen vier verschiedener Patienten wurden Hepatozyten isoliert und die Expression des LH/CG-Rezeptors mittels PCR-Analyse überprüft. (b) Immunhistologischer Nachweis des LH/CG-Rezeptors in humanen Hepatozyten. Für die Betrachtung wurde ein konfokales Laserscanmikroskop von Zeiss verwendet.

3.2.2 Einfluss von hCG auf die CD95-induzierte Apoptose in primären humanen und murinen Hepatozyten

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass hCG *in vivo* vor akutem und chronischem Leberschaden schützt. Daraufhin sollte untersucht werden, ob hCG auch *in vitro* in primären Hepatozyten Apoptose hemmen kann. Dazu wurden primäre humane und murine Hepatozyten isoliert und mit den agonistischen CD95-Antikörpern anti-APO-1 bzw. Jo-2 behandelt und die Zellvitalitäten der

Kulturen bestimmt. In den primären humanen Hepatozyten zeigte sich bereits nach vier Stunden bzw. in primären Maushepatozyten nach 16 Stunden eine deutliche Reduktion der Zellvitalität. Die zusätzliche Behandlung mit hCG führte in humanen Hepatozyten zu einer vollständigen Hemmung der Apoptose (Abb. 15 a) und auch hCG-behandelte Maushepatozyten wiesen eine deutliche Verbesserung der Zellvitalität auf (Abb. 15 b).

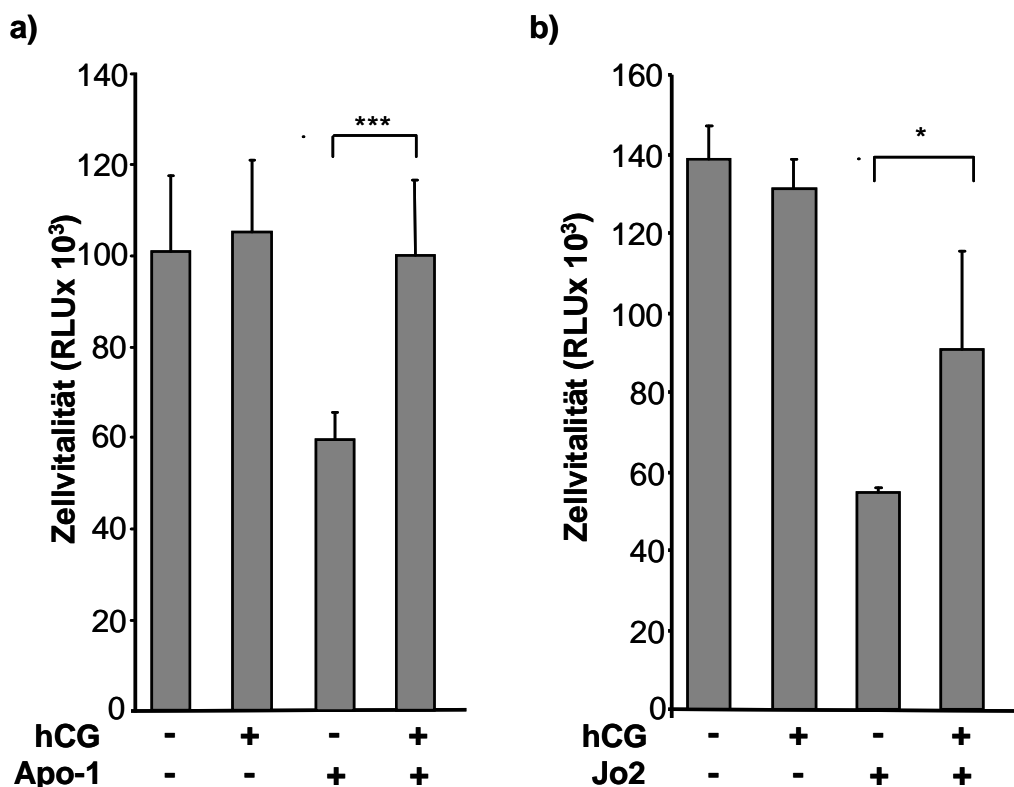


Abb. 15 Anti-apoptotische Wirkung von hCG in primären Hepatozyten

Humane (a) und murine (b) Hepatozyten wurden mit den agonistischen CD95 Antikörpern anti-APO-1 (200ng/ml) bzw. Jo-2 200ng/ml) behandelt sowie mit und ohne hCG (human: 100 U/ml und murin: 200U/ml). Die Vitalität der humanen Zellen wurde nach 4 Stunden und die der Maushepatozyten nach 16 Stunden gemessen. Das Diagramm stellt das Ergebnis von 4 verschiedenen Experimenten dar. (Mittelwerte \pm SD). Signifikanzniveau: ***, $P < 0,001$ und *, $P < 0,05$

3.2.3 Wirkung von hCG auf die T-Zell-vermittelte Apoptose in Hepatozyten

Sowohl in dem akuten als auch in dem chronischen Mausmodell wird der Leberschaden T-Zell-abhängig induziert (Gantner et al., 1995, Xu et al., 2006). Deshalb sollte mit Hilfe von Kokultorexperimenten die T-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion auf primäre humane Hepatozytenkulturen nach hCG Behandlung untersucht werden. Für diese Experimente wurden Peptid-spezifische HLA.A *0201 zytotoxische T-Zellen (CTLs) und HLA.A*0201 positive humane Hepatozyten als

Zielzellen verwendet. Diese wurden durch die Perfusion von Lebergewebe einer Hemihepatektomie gewonnen. Die pHep wurden mit dem Peptid p53.264-272 beladen und entsprechend gegen dieses Peptid gerichtete T-Zellen verwendet. Es folgte eine Behandlung der Zellen mit hCG (100 U/ml). Vier Stunden nach Kokultivierung in verschiedenen Zellverhältnissen konnte durch einen ^{51}Cr -Release-Assay gezeigt werden, dass die Hepatozyten effizient durch die CTLs getötet werden (Abb. 16). In Gegenwart von hCG zeigte sich in allen Ansätzen eine deutliche Hemmung der Zytotoxizität. Bei einem Effektor-Zielzellen-Verhältnis von 1:1 reduzierte hCG die CTL-induzierte Apoptose um mehr als die Hälfte und bei einem Verhältnis von 0,3 : 1 sank die Zytotoxizität von 30% auf lediglich 5%. Ein Effektor-Zielzellen-Verhältnis von 0,1 : 1 führte sogar zu einer Hemmung von 12 auf nur noch 1%.

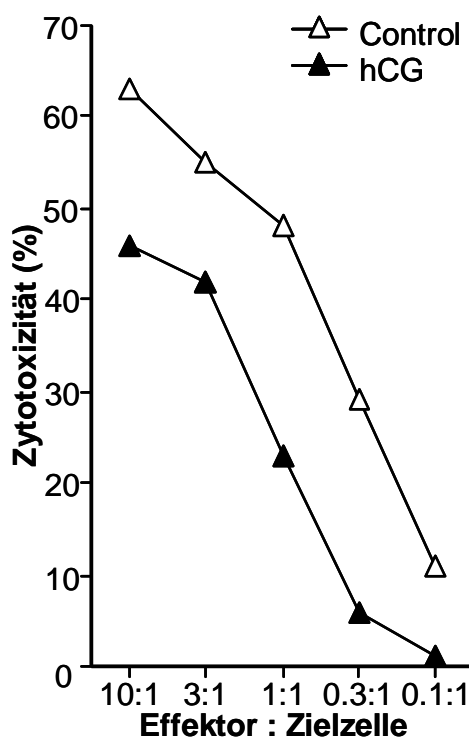


Abb. 16 Kokulturassay mit zytotoxischen T-Zellen und humanen primären Hepatozyten

Peptidspezifische zytotoxische T-Zellen und HLA.A*0201 positive Hepatozyten wurden in verschiedenen Verhältnissen für 4 Stunden zusammen kultiviert und die Zytotoxizität mittels eines ^{51}Cr -release-Assays bestimmt.

3.3 Untersuchung der immunsuppressiven hCG-Wirkung

3.3.1 Zytokin Profile im Serum von Mäusen mit Leberschaden nach hCG-Behandlung

Um einen direkten Einfluss von hCG auf das Immunsystem zu charakterisieren, sollte zunächst das Zytokinprofil im Serum der Tiere mit und ohne hCG Behandlung verglichen werden. Dazu wurden gepoolte Seren von Mäusen mit Leberschaden bzw. hCG-behandelter Tiere für einen Zytokin-Array verwendet. Sowohl in den Seren der Mäuse mit akutem Leberschaden (ConA) als auch in dem Serum mit chronischem Leberschaden (IacBSA) kam es zur einer Erhöhung der Konzentration mehrerer Zytokine (Abb. 17 a). Man konnte aber deutlich erkennen, dass ConA zu einem deutlicheren Anstieg von Zytokinen führte.

Es zeigte sich, dass IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) das einzige Zytokin war, das deutlich bei beiden Mausmodellen herunterreguliert wurde, weshalb sich in weiteren Experimenten auf dieses Zytokin konzentriert wurde. IL-16 ist ein Chemotaxin, welches verschiedene Immunzellen, die das Molekül CD4 auf ihrer Oberfläche exprimieren, anlockt. In Abbildung 17 b und c ist die quantitative Auswertung im Vergleich für IL-16 dargestellt. Im ConA Modell war die Signalintensität um mehr als das 20 fache erhöht und sank nach hCG Behandlung auf Kontroll-Niveau. Im chronischen IacBSA Modell zeigte sich auch eine deutliche Reduktion der Signalintensität nach hCG Gabe von 28 auf nur 8 fach.

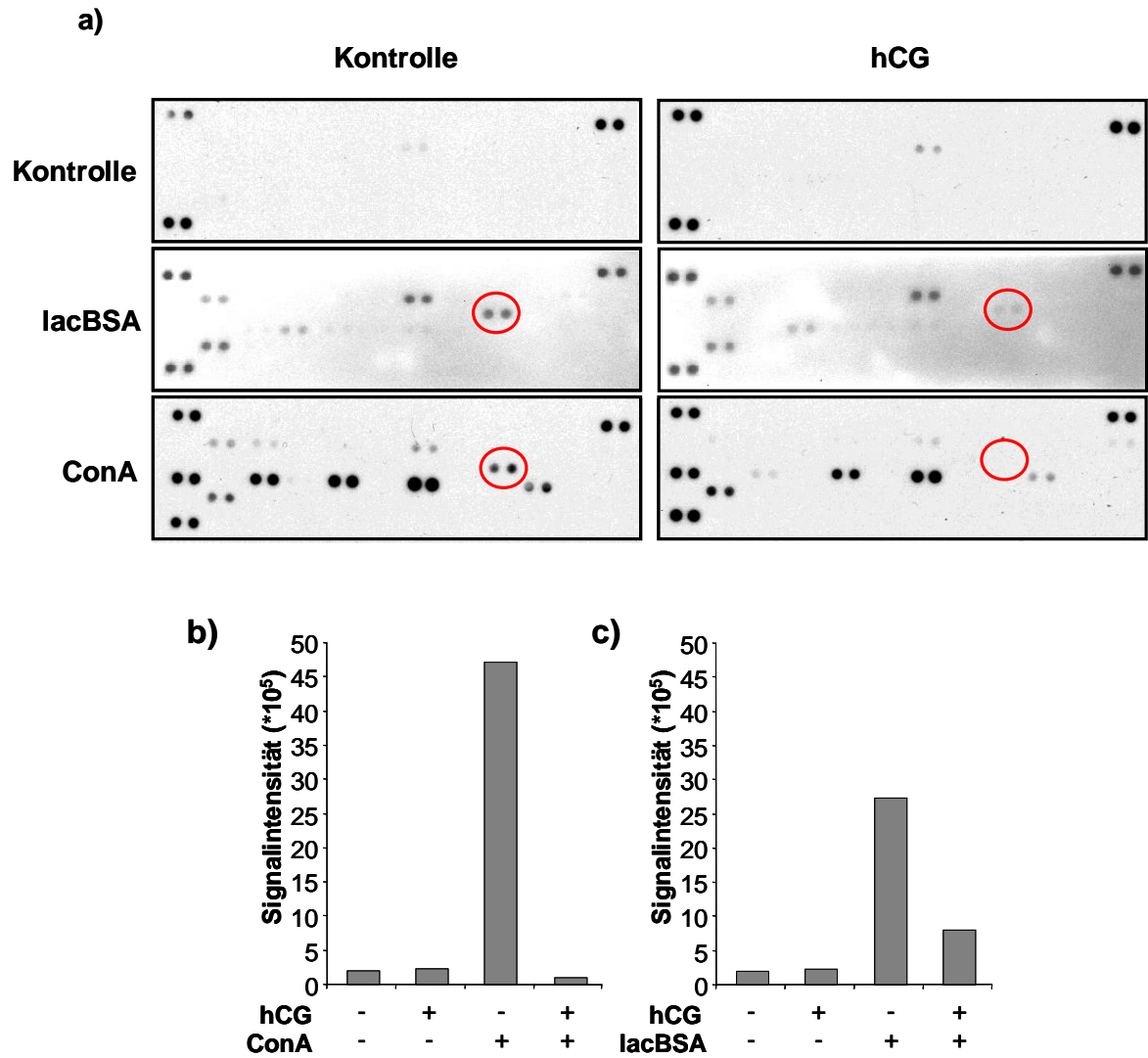


Abb. 17 Herunterregulation von IL-16 in hCG-behandelten Mäusen

(a) Für die Erstellung eines Zytokinprofils der Seren verschieden behandelter Mäuse wurde ein Zytokin-Antikörper-Array verwendet. Die rot umrandeten Punkte zeigen die IL-16 Expression. Der Array wurde mit Hilfe von Image J quantitativ ausgewertet. (b) Quantifizierung des Arrays mit den Seren der ConA- und hCG- behandelten Mäuse (c) Quantifizierung des Arrays mit den Seren der lacBSA und hCG- behandelten Mäuse.

3.3.2 IL-16 Expression in Hepatozyten

IL-16 wird von verschiedenen Immunzellen, wie CD4+ und CD8+, Monozyten, B-Zellen, Eosinophilen, Mastzellen und dendritischen Zellen sowie von Epithelzellen, Fibroblasten und neuronalen Zellen, exprimiert (Elssner et al., 2004 Kaser et al., 1999; Rumsaeng et al., 1997; Sciaky et al., 2000). Um in weiteren Experimenten den Einfluss von hCG auf die Freisetzung von IL-16 näher zu untersuchen wurden zunächst humane Hepatozyten verschiedener Präparationen auf dessen Expression getestet. Sowohl auf RNA-Ebene mittels PCR (Abb. 18 links) als auch immunhistologisch auf Proteine-Ebene (Abb. 18 rechts) konnte die Expression von IL-16 nachgewiesen werden.

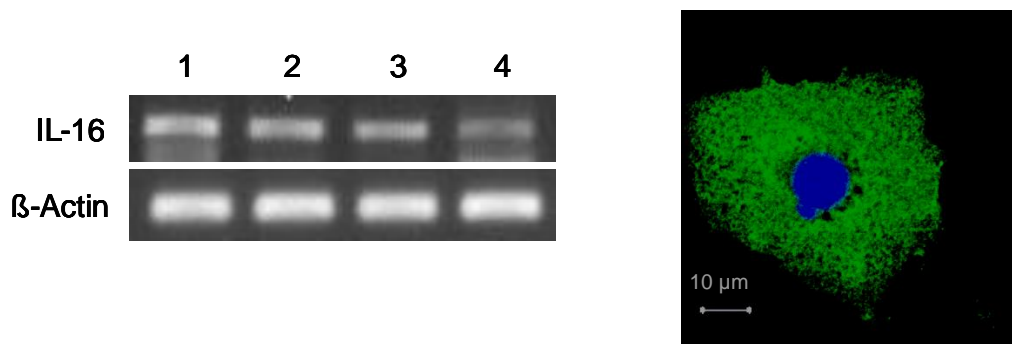


Abb. 18 IL-16 wird in humanen Hepatozyten exprimiert

IL-16 PCR von vier verschiedenen Präparationen humaner Hepatozyten (links). Die rechte Abbildung zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung von IL-16 (grün) in humanen Hepatozyten. Die Kerne wurden mit Höchst blau gefärbt und die Zellen am konfokalen Laser-Scan-Mikroskop betrachtet.

3.3.3 Caspase-3-Aktivität und IL-16 Konzentration nach hCG-Behandlung in primären humanen Hepatozyten

IL-16 wird als Vorläuferprotein synthetisiert und erst durch eine Caspase-3-vermittelte Spaltung in die biologisch aktive Form überführt. Aus diesem Grund wurde die Aktivität von Caspase-3 in den Überständen von primären humanen Hepatozyten, die mit dem agonistischen CD95-Antikörper APO-1 und hCG behandelt wurden, gemessen. Die Induktion von Apoptose erhöhte die Aktivität von Caspase-3 und hCG erniedrigte diese signifikant (Abb. 19 a). Anschließend wurde in denselben Überständen die Konzentration von IL-16 mit Hilfe eines ELISAs gemessen. Wie erwartet stieg diese in den Überständen der Zellen, die nur mit anti-APO-1 behandelt wurden, stark an. Die Behandlung mit hCG führte zu einer drastischen Reduktion von IL-16 von 35 pg/ml auf 20 pg/ml (Abb. 19 b).

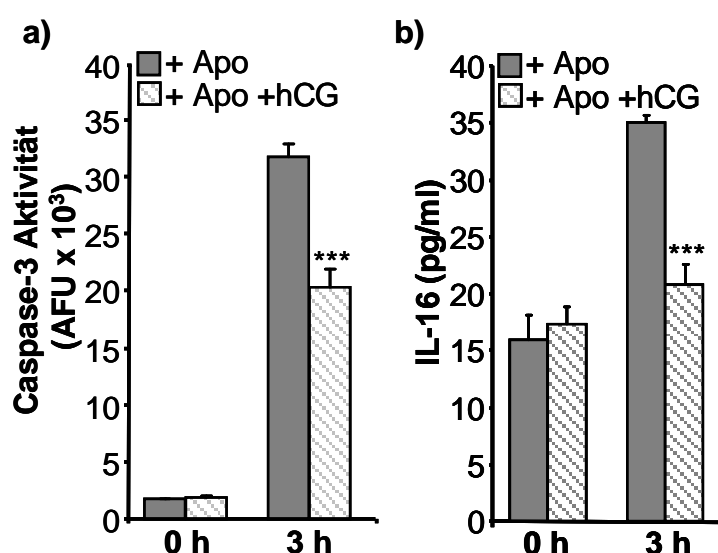


Abb. 19 Reduktion der Caspase-3 Aktivität und IL-16-Konzentration durch hCG

(a) Humane primäre Hepatozyten wurden für 3 Stunden mit dem CD95-Antikörper anti-APO-1 (200ng/ml) behandelt, sowie mit und ohne hCG (100 U/ml). In den Überständen der Zellen wurde die Caspase-3 Aktivität mit einem fluoreszierenden Caspase-3 Substrat und (b) die IL-16 Konzentration mit einem ELISA bestimmt. Das Diagramm stellt das Ergebnis von 3 verschiedenen Experimenten dar. (Mittelwerte \pm SD). Signifikanzniveau: ***, $P < 0,001$

3.3.4 Effekt von hCG auf die Chemotaxis von CD4⁺ T-Zellen durch IL-16

Da IL-16 ein CD4⁺ Zell-spezifisches Chemotaxin ist, wurde die Anlockung von CD4⁺ T-Zellen in einem Migrationsassay in An- und Abwesenheit von hCG untersucht. Dazu wurden primäre humane und murine Hepatozyten mit den agonistischen Antikörpern anti-APO-1 bzw. Jo-2 behandelt, um die Ausschüttung von IL-16 zu bewirken. Gleichzeitig wurden die Zellen mit hCG behandelt. Anschließend wurden die Zellen für den Migrationassay verwendet (Abb. 20 a). Die Apoptose-Induktion in humanen Hepatozyten (Abb. 20 b) wie auch in Maushepatozyten (Abb. 20 c) führte zu einer stark erhöhten Migration von CD4⁺ T-Zellen (human: 268500 Zellen, murin: 116500 Zellen), wohingegen die Behandlung mit hCG diese signifikant hemmte (human: 146000 Zellen, murin: 76500 Zellen). Um sicherzustellen, dass die Chemotaxis auch auf IL-16 zurückzuführen war, wurde ein Teil der Zellen zusätzlich mit einem blockierenden IL-16 Antikörper behandelt, der die Migration von CD4⁺ T-Zellen reduzierte.

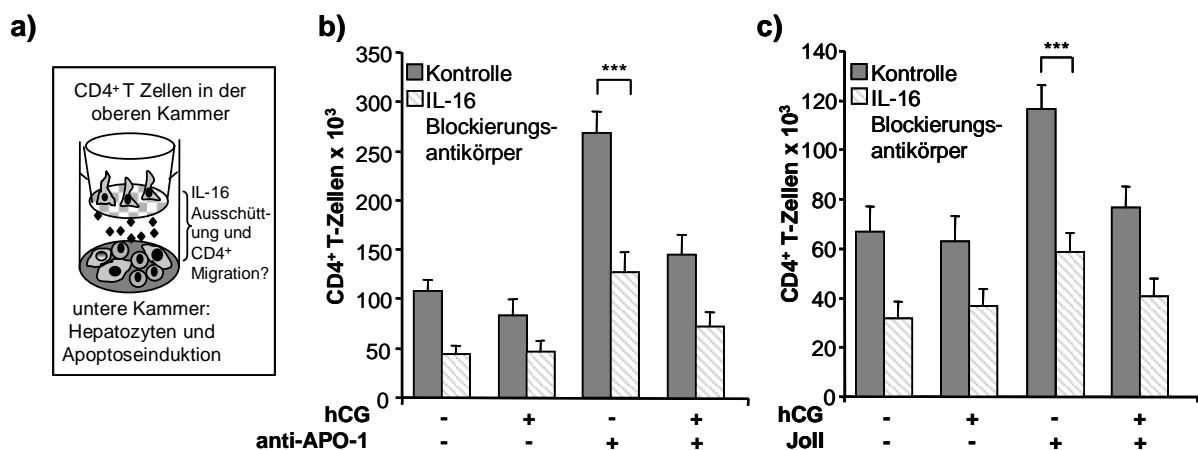


Abb. 20 Reduktion der Chemotaxis von CD4⁺ Zellen durch hCG

(a) Schema des Migrationsassays. In der oberen Kammer befanden sich CD4⁺ T-Zellen und in der unteren Kammer die hCG und anti-APO-1 bzw. Jo-2-behandelten primären Hepatozyten. Humane (b) und murine (c) primäre Hepatozyten wurden für 3 Stunden mit dem CD95-Antikörper anti-APO-1 bzw. Jo2 behandelt, sowie mit und ohne hCG. Als Kontrolle wurde ein Teil der Zellen mit einem IL-16 Blockierungsantikörper (5 µg/ml) behandelt. Die behandelten Zellen wurden für den Assay verwendet und die migrierten CD4⁺ T-Zellen wurden gezählt (Mittelwerte ± SD). Signifikanzniveau: ***, P < 0,001.

3.3.5 IL-16 Konzentration im Serum von Patienten mit entzündlichen Lebererkrankungen

Da in den beschriebenen Hepatitis-Mausmodellen die Konzentration von IL-16 im Serum erhöht war, wurden Seren von Patienten mit autoimmuner Hepatitis (AIH), nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH), Hepatitis B und C (HBV und HCV) ebenfalls auf die Anwesenheit von IL-16 untersucht. Auch in den Seren der Patienten verglichen mit gesunden Menschen konnten stark erhöhte IL-16 Konzentrationen nachgewiesen werden (Abb. 21). In Patienten mit autoimmuner Hepatitis konnte der höchste Anstieg von IL-16 mit einer Konzentration von 0,58 $\mu\text{g/ml}$ im Gegensatz zu Seren gesunder Patienten mit 0,15 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt werden. Aber auch in Patientenseren mit anderen immunopathologischen Lebererkrankungen war ein sehr hoher Anstieg an IL-16 zu verzeichnen. Demnach scheint das Zytokin IL-16 eine wichtige pathophysiologische Rolle bei Patienten mit autoimmuner Hepatitis und anderen Lebererkrankungen wie NASH, HBV und HCV zu spielen.

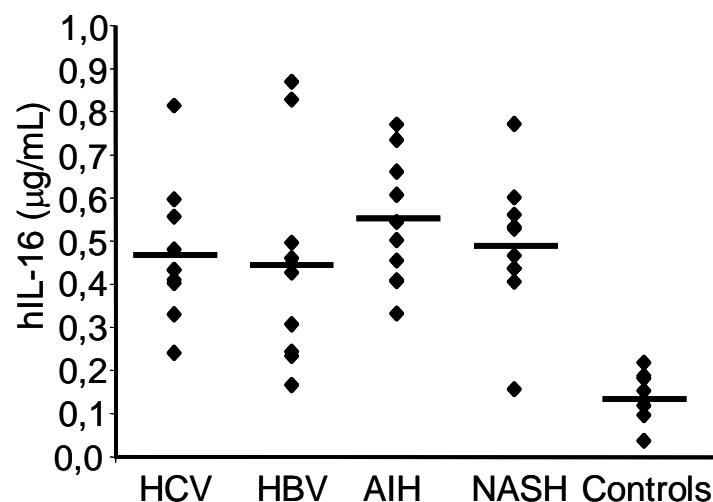


Abb. 21 IL-16 Konzentration in Seren von Patienten mit immunopathologischen Lebererkrankungen

Die IL-16 Konzentration in den Seren von Patienten mit HCV, HBV, AIH, NASH wurde mittels eines IL-16 ELISAs bestimmt. Es wurde jeweils der Mittelwert von 9 verschiedenen Patienten ermittelt. Als Kontrolle wurde IL-16 in den Seren von gesunden Menschen gemessen.

3.3.6 cAMP-Konzentration in Hepatozyten und der Leber nach hCG-Behandlung

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass hCG sowohl einen Einfluss auf Hepatozyten als auch auf Immunzellen hat. Wie bereits beschrieben führt hCG zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase (Eyster und Stouffer, 1985). Aus diesem Grund stellte sich die Frage, auf welche Zellen und in welchen Organen hCG im Hinblick auf die cAMP Konzentration einen Einfluss hat. Es wurde die cAMP Menge in Leber und Milz hCG-behandelter Mäuse sowie primärer humaner Hepatozyten und CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Wie in Abbildung 22 a zu sehen ist, stieg die Konzentration in der Leber nach hCG-Behandlung signifikant von 5,73 pmol/mL auf 14,76 pmol/mL an, wohingegen in der Milz keine Erhöhung zu beobachten war (Abb. 22 a). Weiterhin reagierten die primären humanen Hepatozyten auf hCG, indem sie das Dreifache an cAMP bildeten. In CD4⁺ T-Zellen konnte jedoch nur ein geringer cAMP-Anstieg beobachtet werden (Abb. 22 b).

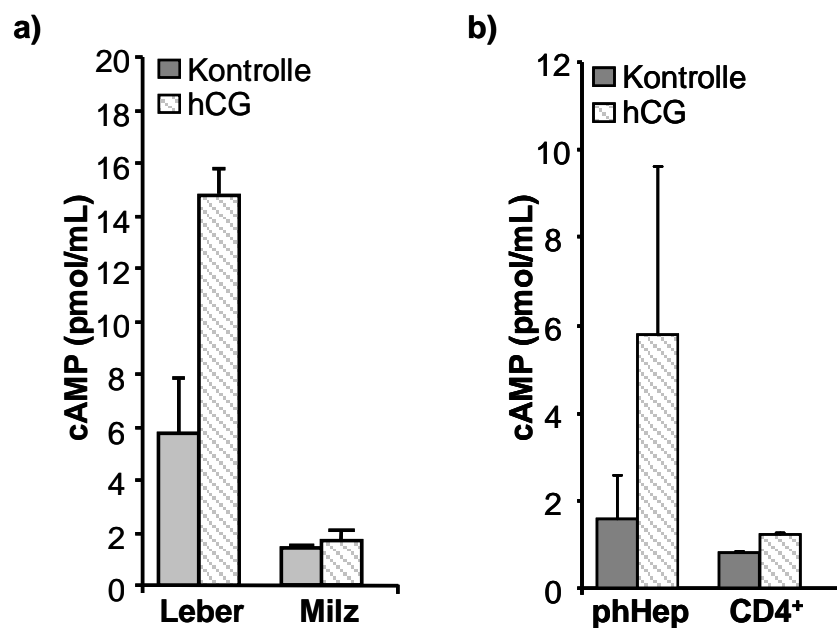


Abb. 22 Anstieg der cAMP Konzentration in Leber und Milz

Die cAMP Konzentration in Leber oder Milzextrakten von hCG behandelten Mäusen (a) sowie in humanen primären Hepatozyten und CD4⁺ T-Zellen (b) wurde mittels ELISA bestimmt (Mittelwerte \pm SD). Den Mäusen wurde 7,5 U hCG/g Körpergewicht intraperitoneal gespritzt und nach 30 min die Organe entnommen. Die Anzahl an Mäusen für jede Behandlung betrug n= 5. Die primären Hepatozyten und CD4⁺ T-Zellen wurden für 30 min mit 100 IU/ml behandelt. Das Diagramm stellt das Ergebnis von drei verschiedenen Experimenten dar.

3.4 Untersuchung des hCG-Signalweges in primären Hepatozyten

3.4.1 Wirkung von hCG auf die Proteinkinase Akt

Die Ausschüttung von cAMP führt in den meisten Zellen zu einer Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges (Li et al., 2000, Gates et al., 2009). Aus diesem Grund wurde die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt sowohl in humanen Hepatozyten als auch in verschiedenen Immunzellen (CD4⁺, CD8⁺ und Monozyten) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass hCG zu einer erhöhten Phosphorylierung von Akt in primären Hepatozyten führt, wohingegen sich die Phosphorylierung in CD4⁺, CD8⁺ und Monozyten nach hCG Behandlung nicht verändert hatte.

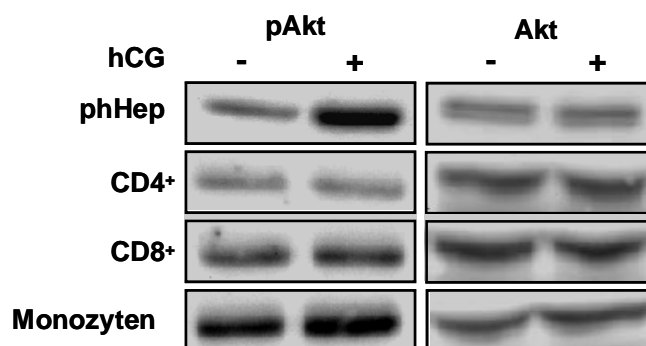


Abb. 23 Akt Phosphorylierung in verschiedenen primären Zellen

Primäre humane Hepatozyten, CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und Monozyten wurden für 30 min mit 100 U/ml hCG behandelt und anschließend die Proteinlysate in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die Proteine mit den Antikörpern anti-phospho-Akt und anti-Akt inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein HRP-konjugierter Antikörper verwendet. Gesamt-Akt diente als Ladungskontrolle.

3.4.2 Regulation der pro-apoptotischen Gene Bim und Puma

Für die weitere Analyse, welche Gene hCG in Hepatozyten reguliert, wurde ein DNA-Micro-Array mit primären humanen Hepatozyten durchgeführt. Dafür wurden humane Hepatozyten-Kulturen mit hCG behandelt und anschließend für den Array die RNA isoliert. Nach der Auswertung des Microarrays fiel das Hauptaugenmerk auf proapoptotische Gene. Auffallend war eine drastische Herunterregulation in hCG behandelten Hepatozyten des proapoptotischen Gens Puma.

Für die Bestätigung des Ergebnisses aus dem Array wurde eine Real-Time-PCR (Abb. 24 a) und eine Western-Blot-Analyse (Abb. 24 b) durchgeführt. Neben der

Regulation von Puma wurde auch der Einfluss von hCG auf die Expression des Gens Bim untersucht. Es handelt sich hierbei um ein weiteres proapoptisches Gen, welches wie Puma zur Bcl-2 Familie gehört. Sowohl durch Real-Time-PCR als auch durch Western-Blot-Analyse konnte eine deutliche Herunterregulation beider Gene gezeigt werden. Puma war nach 24 Stunden hCG-Behandlung dreifach und Bim sechsfach niedriger exprimiert als in unbehandelten Hepatozyten.

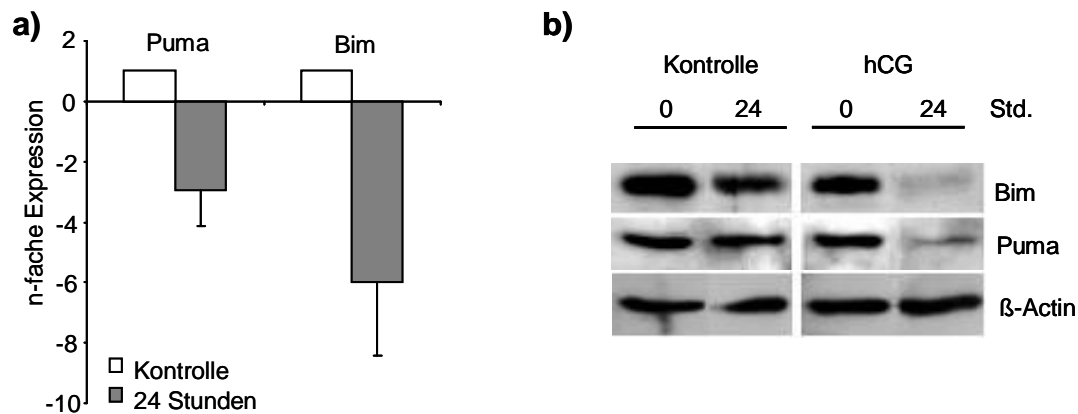


Abb. 24 hCG führt zur Herunterregulation von Bim und Puma

Primäre humane Hepatozyten wurden für 24 Stunden mit 100 U/ml hCG behandelt. (a) Quantitative Real-Time PCR von Bim und Puma mRNA. Die Expression wurde auf Rp11 abgeglichen. (n=4, Mittelwerte \pm SD) (b) Die Proteinlysate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit den Antikörpern anti-Bim und anti-Puma inkubiert. Als Ladungskontrolle dient β -Actin.

3.4.3 Lokalisation und Promotoraktivität von Foxo3a nach hCG-Behandlung

Puma und Bim sind Zielgene des Transkriptionsfaktors Foxo3a, welcher nach der Aktivierung des PI3-Kinase/Akt Signalweges phosphoryliert und aus dem Kern der Zelle transportiert wird. Dies führt zu einer Hemmung der transkriptionellen Aktivierung von Foxo3a, wodurch die proapoptischen Zielgene nicht mehr transkribiert werden können (Birkencamp und Coffey, 2003).

Für die Identifikation der Lokalisation von Foxo3a nach hCG Behandlung wurden Maushepatozyten mit drei verschiedenen Foxo3a Konstrukten (WT-ER, TM-ER und TM Δ DB-ER) transfiziert. Ihre biologische Aktivität wird durch die Gabe von 4-Hydroxytamoxifen induziert (siehe 2.1.2; Tran H. et al., 2002). In der Foxo3a Mutante TM-ER sind alle drei Akt Phosphorylierungsstellen durch Alanin ausgetauscht worden, so dass Akt Foxo3a an diesen Stellen nicht mehr phosphorylieren kann. Die Mutante TM Δ DB-ER hat zusätzlich zu den Mutationen der Akt-

Phosphorylierungsstellen die DNA-Bindedomäne deletiert, wodurch Foxo3a nicht mehr an die Promotorregionen der Zielgene binden kann.

Abbildung 25 a zeigt die immunhistologische Färbung von Foxo3a in transfizierten Maushepatozyten. Nach der Induktion mit Tamoxifen war das Foxo3a WT-Protein in den unbehandelten Hepatozyten hauptsächlich im Kern lokalisiert. Nach der Behandlung mit hCG hingegen akkumulierte Foxo3a im Zytoplasma. Interessanterweise zeigte sich nach hCG Behandlung keine Veränderung der Foxo3a Lokalisation in den Hepatozyten, die mit der Phosphorylierungsmutante transfiziert wurden. Die Zellen, die mit der DNA-Bindungsmutante transfiziert wurden zeigten, wie bereits angenommen, auch keine Translokation. Die Immunfärbungen wurden zusätzlich quantitativ ausgewertet. Sie zeigten, dass in der Abwesenheit von hCG nur 11 % der Zellen das Foxo3a WT-Protein im Zytoplasma aufwiesen, wohingegen nach hCG-Behandlung in 58 % der Hepatozyten Foxo3a aus dem Kern transportiert wurde. Über 70% der Zellen, die mit den Mutanten transfiziert wurden, zeigten in Anwesenheit von hCG keine Translokation von Foxo3a. Lediglich nur 4 % der TM-ER (Akt-Phosphorylierungsmutante) transfizierten Zellen und 2 % der TM Δ DB-ER (DNA-Bindungsmutante) transfizierten Hepatozyten wiesen Foxo3a im Zytoplasma auf (Abb. 25 b). Dies zeigt, dass nur das Wildtyp (WT) Foxo3a Protein durch hCG reguliert wird und die Phosphorylierung durch die Proteinkinase Akt und DNA-Bindung dafür notwendig sind.

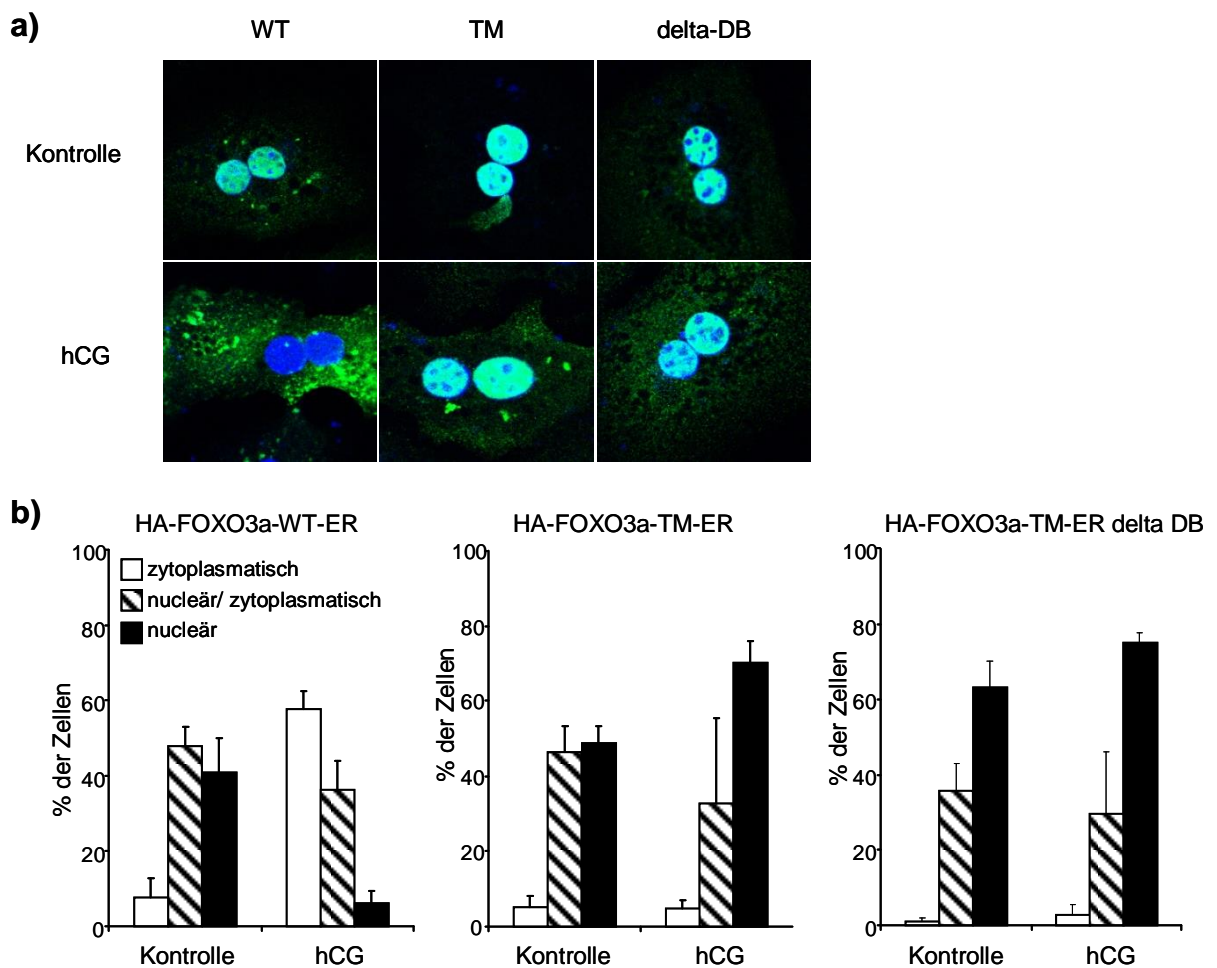


Abb. 25 hCG-vermittelte Translokation von Foxo3a aus dem Zellkern

(a) Primäre Maushepatozyten wurden mit einem Wildtyp (WT-ER) und zwei mutierten Foxo3a Plasmiden (TM-ER und TM Δ DB-ER) transfiziert und für 1 Stunde mit 200 U/ml hCG und 1 μ M Tamoxifen behandelt. Foxo3a (grün) wurde mit einem fluoreszenzmarkierten anti-HA Antikörper nachgewiesen. Die Kerne wurden mit Höchst blau gefärbt. (b) Quantifizierung der zellulären Verteilung von Foxo3a. Es wurden insgesamt 400 Zellen ausgewertet.

Für weitere Bestätigungen, dass hCG die Aktivität von Foxo3a hemmt und dabei die Phosphorylierung durch Akt entscheidend ist, wurden Reporteranalysen durchgeführt. Dafür wurden ebenfalls Maushepatozyten mit den drei Foxo3a Konstrukten und zusätzlich mit dem „Foxo3a responsive element“ (FHRE), welches nach transkriptioneller Aktivierung die Expression eines Luziferase Gens induziert, transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit Tamoxifen zur Induktion der aktiven Foxo3a-Proteine sowie mit hCG für eine Stunde behandelt und anschließend die Promotoraktivität von Foxo3a gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass in den Hepatozyten, die mit dem WT-ER Konstrukt transfiziert wurden, die Expression des Luziferase Gens um die Hälfte reduziert war. Die hCG-Behandlung der Zellen, die mit der Akt Phosphorylierungsmutante TM-ER transfiziert wurden, hatte hingegen keinen Einfluss auf die Aktivität des Luziferase Reporters.

Die Hepatozyten, welche mit der DNA-Bindungs-Mutante transfiziert wurden, zeigten, wie bereits angenommen, keine transkriptionelle Foxo3a-Aktivität (Abb. 26).

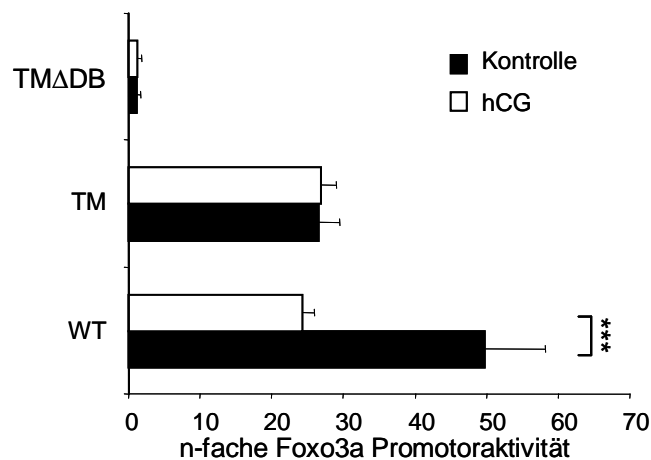


Abb. 26 hCG-vermittelte Inaktivierung der transkriptionellen Aktivität von Foxo3a

Foxo3a Promotoraktivität nach Kotransfektion mit WT-ER, TM-ER und TMΔDB-ER in primären Maushepatozyten. Die Zellen wurden für 48 Stunden mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert und anschließend mit 1 μ M Tamoxifen für eine Stunde und mit 200 U/ml hCG für weitere zwei Stunden behandelt. Daraufhin wurde die Promotoraktivität mit Hilfe eines Luziferase-Assays bestimmt. Das Diagramm stellt das Ergebnis von sechs verschiedenen Experimenten dar (Mittelwerte \pm SD). Signifikanzniveau: ***, $P < 0,001$.

Nachdem die Experimente mit den Foxo3a Mutanten gezeigt hatten, dass Akt eine wichtige Rolle im hCG-Signalweg spielt, wurden humane Hepatozyten mit hCG behandelt und der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung von Akt anschließend im Western-Blot untersucht. Es zeigte sich, dass bereits nach einer halben Stunde eine erhöhte Phosphorylierung von Akt nachgewiesen werden konnte, die mit längerer hCG Behandlung wieder abnahm. Die gesamte Menge des Akt-Proteins veränderte sich dabei nicht.

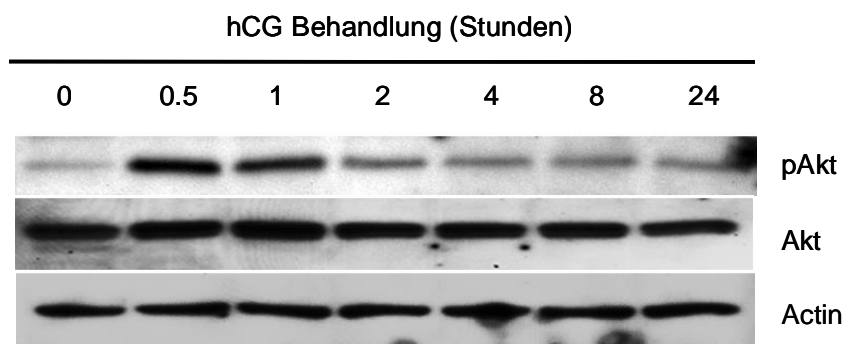


Abb. 27 hCG-induzierte Akt Phosphorylierung im zeitlichen Verlauf

Primäre humane Hepatozyten wurden mit 100 U/ml hCG behandelt. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, lysiert und eine Westernblot-Analyse mit Antikörpern gegen Phospho-Akt, Akt und β -Aktin durchgeführt. Zur Detektion wurde das Nitro-Block-II CDP-Star System verwendet. Die Menge an Gesamt-Akt verändert sich nicht. β -Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

3.4.4 Inhibitorstudien

Für die weitere Charakterisierung des hCG Signalweges wurden primäre humane (Abb. 28 a, c und e) und murine Hepatozyten (Abb. 28 b, d und f) mit Inhibitoren der Adenylatzyklase (a und b), der Proteinkinase A (c und d) und der PI3-Kinase (e und f) behandelt. Die Zellen wurden außerdem mit hCG und mit CD95 spezifischen Antikörpern anti-APO-1 bzw. Jo-2 behandelt. Anschließend wurde die Vitalität der Zellen mit Hilfe eines Biolumineszenz-Assays gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Adenylatzyklase, die Proteinkinase A als auch die PI3-Kinase essentielle Rollen im hCG-Signalweg spielen, da die Behandlung mit diesen Inhibitoren den anti-apoptotischen hCG-Effekt blockierte. Ohne diese Inhibitoren hemmte hCG die Apoptose in murinen und humanen Hepatozyten effektiv.

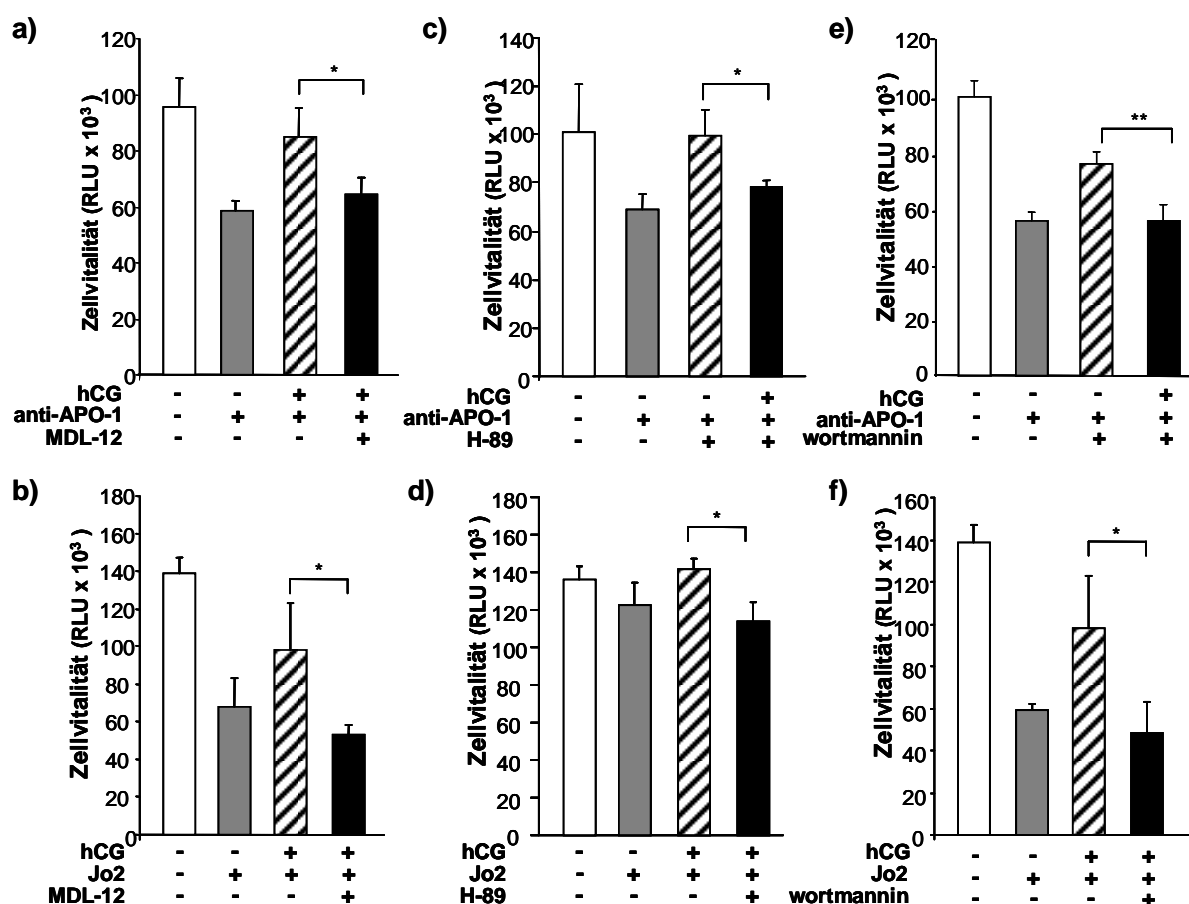


Abb. 28 Hemmung des hCG-Signalweges in Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten wurden für 4 Stunden mit anti-APO-1 (200ng/ml) und hCG (100 U/ml) sowie mit Inhibitoren der (a) Adenylatzyklase (MDL-12, 100 nM) (*P<0,05), (b) Proteinkinase A (H-89, 40 mM) (*P<0,05) und (c) PI3-Kinase (Wortmannin, 20 nm) (**P<0,01) behandelt. (b, d, f) Primäre Maushepatozyten wurden für 24 Stunden mit dem agonistischen CD95 Antikörper Jo-2 (200ng/ml) und zusätzlich mit hCG (200 U/ml) sowie verschiedenen Inhibitoren behandelt. Die Vitalität der Zellen wurde mit einem Biolumineszenz-Assay gemessen (RLU= relative luminescence units). Alle Grafiken stellen das Ergebnis von vier verschiedenen Experimenten dar (Mittelwerte ± SD).

3.4.5 Effekt von hCG auf die Aktivität des G-Proteins Ras

Hirakawa und Ascoli haben bereits gezeigt, dass die Aktivierung des LH/CG Rezeptors durch hCG zu einer Aktivierung von Ras führt (Hirakawa und Ascoli, 2003). Aus diesem Grund wurde die Bedeutung von Ras im hCG Signalweg näher untersucht. Die Behandlung von primären Hepatozyten mit dem Inhibitor des G-Proteins Ras resultierte ebenfalls in einer herabgesetzten hCG-Wirkung, da der anti-apoptotische Effekt von hCG vollständig aufgehoben wurde (Abb. 29 a und b). Weiterhin konnte in einem Ras Aktivitäts-Assay eine signifikant erhöhte Aktivität von Ras sowohl in humanen (Abb. 29 c) als auch in murinen (Abb 29 d) Hepatozyten nach hCG-Behandlung nachgewiesen werden. Dafür wurden die Zellen jeweils für eine halbe Stunde mit hCG behandelt. In humanen Hepatozyten stieg die Aktivität von Ras um das Sechsfache an.

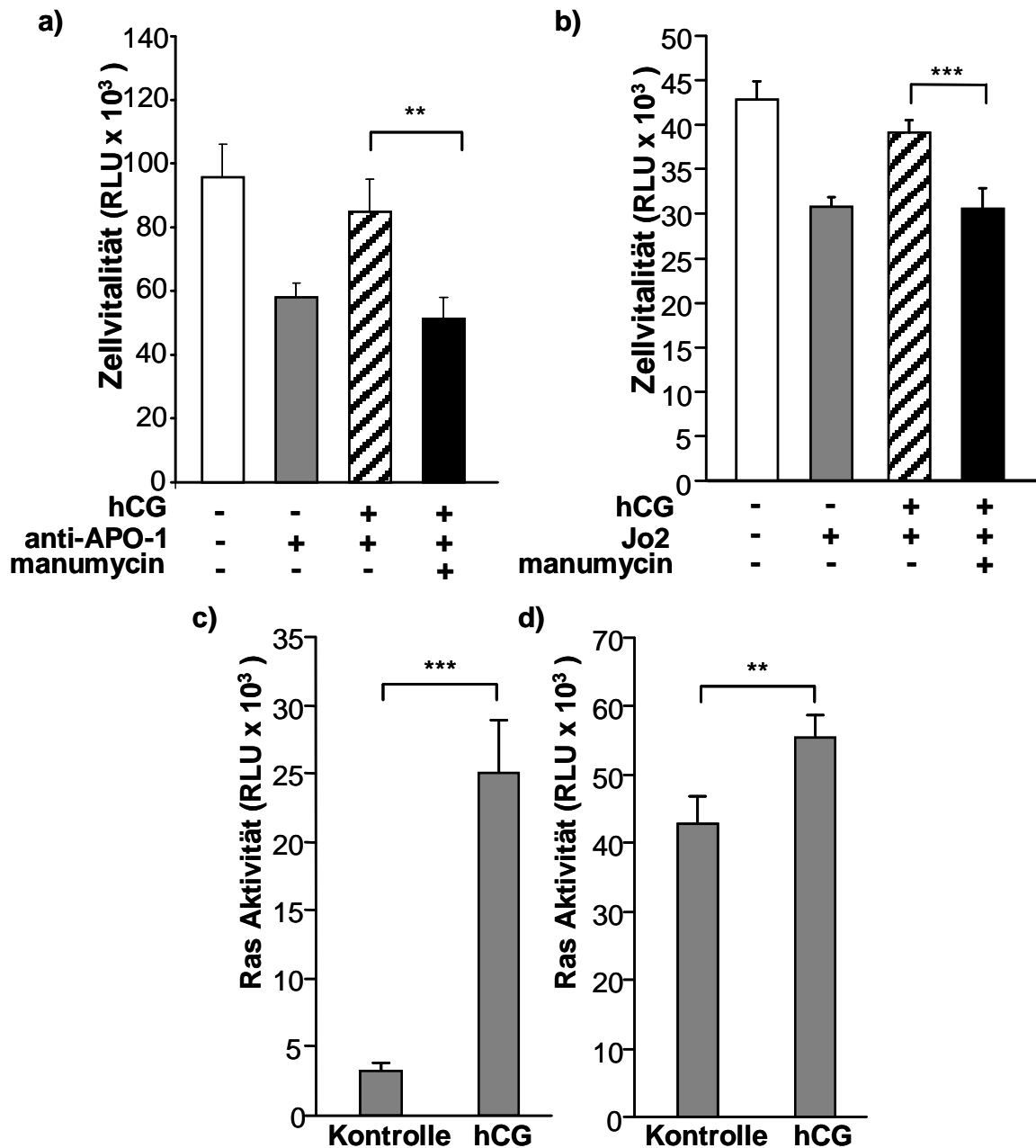


Abb. 29 Erhöhte Ras-Aktivität nach hCG Behandlung

(a) Primäre humane und (b) primäre Maushepatozyten wurden mit den agonistischen CD95 Antikörpern anti-APO-1 (200 ng/ml) bzw. Jo-2 (200 ng/ml) und hCG (100 bzw. 200 U/ml) behandelt. Zusätzlich wurde der Ras Inhibitor Manumycin (2,5 μ M) zugegeben und die Zellvitalität mit einem Biolumineszenz-Assay gemessen. Die Diagramme stellen die Ergebnisse von vier verschiedenen Experimenten dar (Mittelwerte \pm SEM). Signifikanzniveau Human: (** P<0,01), Maus (***0,001). Humane (c) und murine Hepatozyten (d) wurden für 30 min mit 100 U/ml hCG behandelt und die Ras Aktivität bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD bei zwei Duplikaten von drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzniveau Human: (***) P<0,001), Maus (**0,01).

3.5 Abhängigkeit des anti-apoptotischen hCG-Effektes von der Aktivität des Langlebigkeitsproteins Sirt1

Aus Untersuchungen ist bekannt, dass die transkriptionelle Aktivität von Foxo3a nicht nur durch Akt-Phosphorylierung, sondern auch durch die Aktivität der Acetyltransferase Sirt1 moduliert wird (Huang und Tindall, 2007). In Modellorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans* hat man herausgefunden, dass die Überexpression der Orthologen von Sirt1, SIR2 und Sir-2.1, die Lebensspanne dieser Organismen verlängert. (Kaeberlein et al., 1999; Tissenbaum und Guarente, 2001). Brunet et al. haben dann gezeigt, dass in Säugetierzellen das Sir2 Homolog, Sirt1, als Antwort auf oxidativen Stress mit dem Transkriptionsfaktor Foxo3a interagiert. Sie bilden einen Komplex und Foxo3a wird durch Sirt1 deacetyliert, wodurch die Foxo3a-induzierte Apoptose gehemmt wird (Brunet et al., 2004).

3.5.1 Einfluss des Inhibitors Sirtinol für die Foxo3a abhängige hCG-Wirkung

Ausgehend von einer möglichen Interaktion von Foxo3a und dem Sirt1-Protein sollte untersucht werden, ob Sirt1 auch im hCG-Signalweg eine entscheidende Rolle spielt. Um eine Abhängigkeit der anti-apoptotischen hCG-Wirkung zu überprüfen, wurden primäre humane Hepatozyten mit dem agonistischen CD95-Antikörper anti-APO-1 und hCG behandelt. Wie bereits gezeigt, hemmt hCG die CD95-induzierte Apoptose (Abb. 30). Zusätzlich wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Sirt1 Inhibitors Sirtinol behandelt. Man kann deutlich erkennen, dass Sirtinol dosisabhängig die hCG-vermittelte Hemmung der Apoptose verhinderte. Bei einer Konzentration von 40 μM Sirtinol war die protektive Wirkung von hCG vollständig aufgehoben.

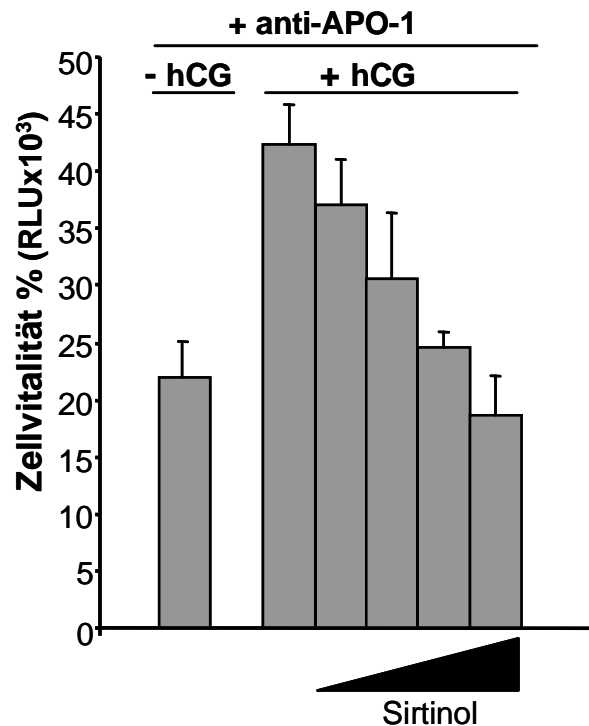


Abb. 30 Hemmung der anti-apoptotischen hCG-Wirkung durch Sirtinol

Primäre humane Hepatozyten wurden mit dem agonistischen CD95 Antikörpern anti-APO-1 und hCG (100U/ml) sowie verschiedenen Konzentrationen des Sirt1 Inhibitors Sirtinoliol (0, 5, 10, 20, 40 μM) behandelt. Die Zellvitalität wurde mit einem Biolumineszenz-Assay gemessen und ist als % Apoptose in Bezug auf die unbehandelten Zellen dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte ± SD von vier unabhängigen Experimenten.

3.5.2 Translokation und Modifikation von Sirt1 nach hCG-Behandlung

Weiterhin wurde mit Hilfe von Western-Blot-Analysen die Modifikation durch Phosphorylierung von Sirt1 nach hCG-Behandlung untersucht. Außerdem wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, um eine mögliche Translokation von Sirt1 nachzuweisen. Die Färbungen zeigten in humanen Hepatozyten eine deutliche Translokation des Sirt1-Proteins nach hCG-Behandlung in den Zellkern. 62 % der hCG-behandelten Zellen im Vergleich zu 6% der unbehandelten Zellen wiesen Sirt1 im Kern auf (Abb. 31 a). Außerdem konnte sowohl in Gewebeschnitten der Leber von Mäusen als auch in primären humanen Hepatozyten eine stark erhöhte Phosphorylierung des Sirt1-Proteins nach hCG-Behandlung gezeigt werden (Abb 31 b).

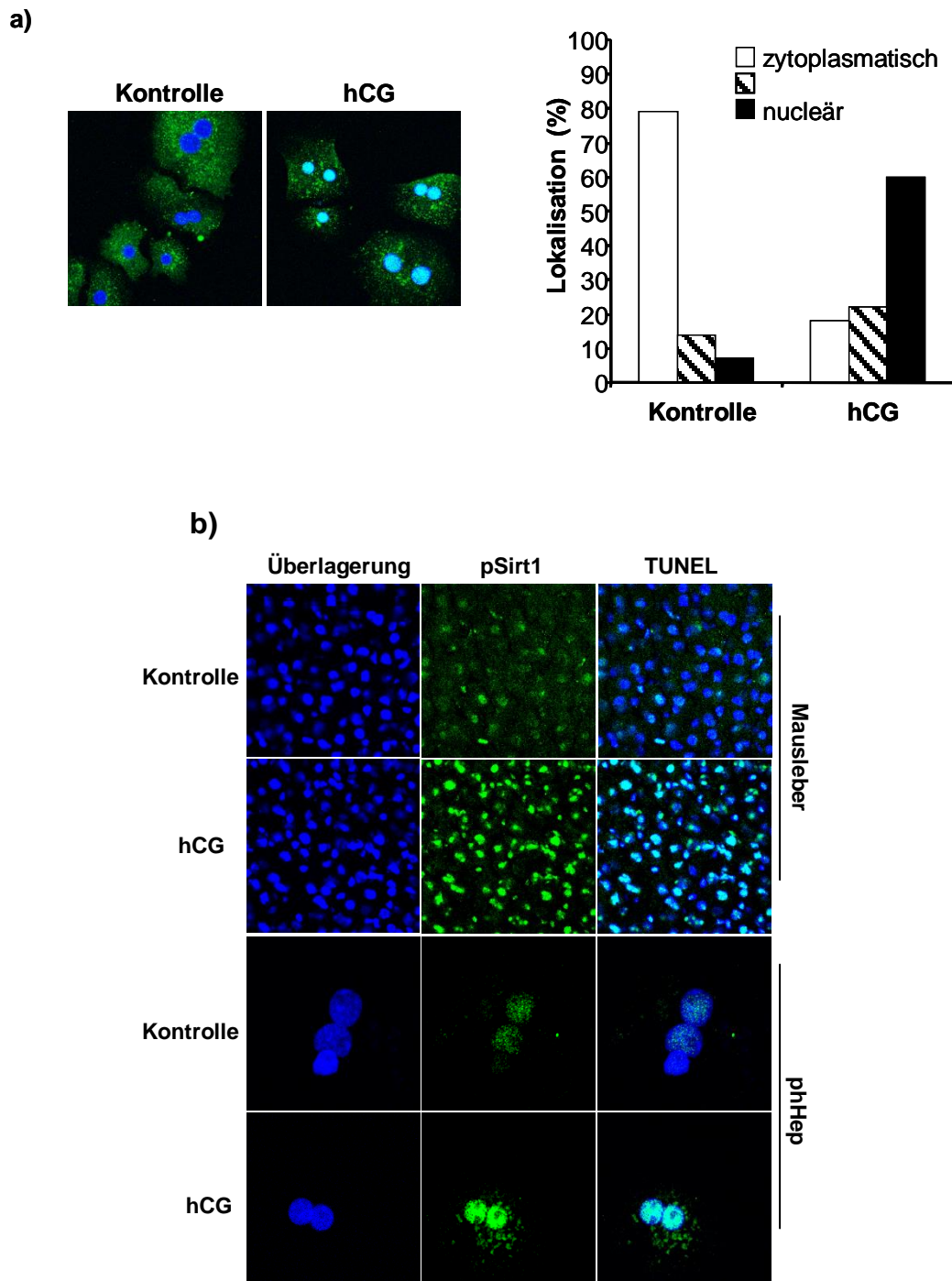


Abb. 31 Aktivierung von Sirt1 durch Phosphorylierung und Translokation in den Kern

(a) Immunfluoreszenzfärbung von Sirt1 in primären humanen Hepatozyten, die für 1 Stunde mit hCG (100U/ml) behandelt wurden. Die rechte Abbildung zeigt die quantitative Auswertung der Lokalisation von Sirt1 in 100 Zellen. (b) Immunfluoreszenzfärbung von pSirt1 in Gewebeschnitten von hCG-behandelten Mäusen und primären humanen Hepatozyten, die eine Stunde mit 100 U/ml hCG behandelt wurden.

Die Western Blot Analyse zeigte ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Phosphorylierung bereits nach einer halben Stunde, die mindestens über acht Stunden anhielt (Abb 32 a).

Um die Abhängigkeit der Sirt1 Phosphorylierung vom beschriebenen hCG-Signalweg (siehe 3.4) zu untersuchen wurden humane Hepatozyten mit verschiedenen Inhibitoren des Signalweges behandelt und anschließend die Phosphorylierung von Sirt1 im Western Blot nachgewiesen (Abb. 32 b). Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit den Inhibitoren der PI3-Kinase, der Proteinkinase Akt und der Proteinkinase A die Phosphorylierung von Sirt1 durch hCG signifikant reduzierte.

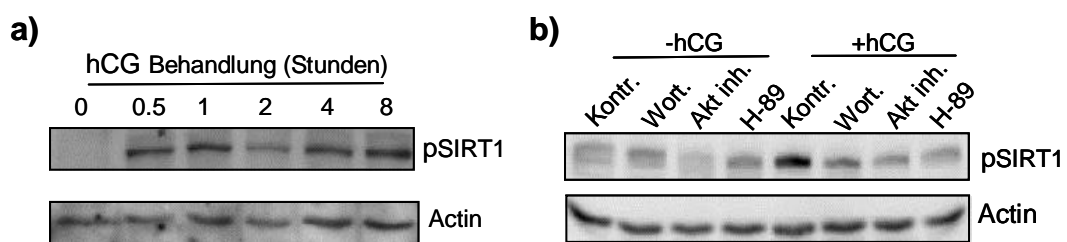


Abb. 32 hCG-abhängige Phosphorylierung von Sirt1

a) Western Blot einer Zeitkinetik hCG behandelte (100U/ml) humane Hepatozyten. Die Proteinlysate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die Proteine mit dem Antikörper anti-pSirt1 inkubiert. Als Sekundäntikörper wurde ein HRP-konjugierter Antikörper verwendet. Actin diente als Ladungskontrolle. (b) Inhibitoren des hCG Signalweges hemmen die Phosphorylierung von Sirt1 durch hCG. Primäre humane Hepatozyten wurden 1 Stunde mit den verschiedenen Inhibitoren vorbehandelt (Wort: Wortmannin, 10 nM; Akt Inh.: Akt inhibitor IV, 100 nM; H-89: PKA-Inhibitor, 20µM) und anschließend für eine Stunde mit 100 U/ml hCG behandelt. Für die Western-Blot-Analyse wurden die Antikörper anti-pSirt1 und als Ladungskontrolle anti-Actin verwendet.

3.5.3 Wirkung von Sirt1 auf die transkriptionelle Aktivität von Foxo3a

Wie bereits in einem vorangegangenen Experiment gezeigt werden konnte, hemmt hCG die Aktivität von Foxo3a und es ist auch aus der Literatur bekannt, dass Sirt1 den Transkriptionsfaktor inaktivieren kann (Motta et al., 2004). Deshalb sollte in diesem Versuch geklärt werden, inwieweit die Expression von Sirt1 die hCG-vermittelte Hemmung der transkriptionellen Aktivität von Foxo3 beeinflusst. Primäre Maushepatozyten wurden noch an dem Tag der Präparation mit 1 µg der Plasmide Sirt1 WT, FHRE und pGL3 (Leervektor) transfiziert. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen für eine Stunde mit hCG behandelt und die Luziferaseaktivität in einem Fluoreszenzlesegerät gemessen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination von hCG und Sirt1 tatsächlich die Promotoraktivität des FHRE-Elements um mehr als das Fünffache reduzierte, wohingegen hCG oder die Transfektion mit Sirt1 alleine dafür nicht ausreichten (Abb. 33)

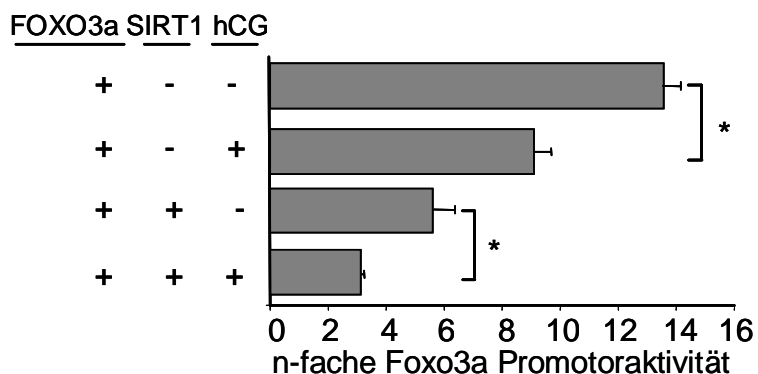


Abb. 33 Verstärkte Hemmung der Aktivität von Foxo3a durch Sirt1 und hCG

Promotoraktivität von Foxo3a in Maushepatozyten nach Koftransfektion von Sirt1. Die hCG-Behandlung (200 U/ml) erfolgte für eine Stunde. Die Daten stellen die n-fache Promotoraktivität abzüglich der Hintergrundkontrolle (pGL3) dar. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzniveau (* $P < 0,05$).

3.5.4 hCG erhöht Deacetylierung von Foxo3a

Aus Untersuchungen von Brunet et al. ist bekannt, dass Sirt1 Foxo3a stressabhängig durch Deacetylierung reguliert (Brunet et al., 2004). Durch Immunpräzipitation von Foxo3a und anschließender Western-Blot-Analyse mit einem anti-Acetylated-Lysine Antikörper sollte analysiert werden, ob hCG zu einer Deacetylierung von Foxo3a führt. Diese Vermutung lag nach den Ergebnissen aus den vorangehenden Experimenten, in denen eine Aktivierung von Sirt1 durch hCG gezeigt werden konnte (siehe 3.5.2), nahe. Für die Immunpräzipitation wurden primäre humane Hepatozyten verwendet, die für eine Stunde mit 100 U/ml hCG behandelt wurden. Daraufhin wurden die Zellen in Lysepuffer geerntet. Der Protein-Antikörper Komplex wurde mit der Zugabe von 1 µg Foxo3a Antikörper und 60 µl Protein A-Agarose präzipitiert. Nach Zugabe von Probenpuffer und Erhitzung auf 95°C wurde das Immunpräzipitat im Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem acetylierten Lysin Antikörper.

Es stellt sich heraus, dass die Behandlung mit hCG zu einer Deacetylierung von Foxo3a führte. Wie in Abbildung 34 erkennbar ist, konnte man nach hCG-Behandlung eine deutlich schwächere Bande für acetyliertes Foxo3a nachweisen als es in unbehandelten Hepatozyten der Fall war.

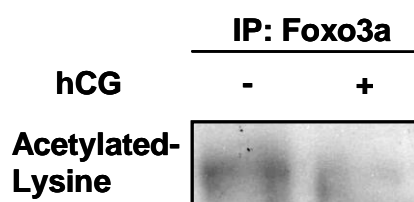


Abb. 34 Deazetylierung von Foxo3a nach hCG Behandlung

Immunpräzipitation von Foxo3a in primären humanen Hepatozyten. Die Zellen wurden für eine Stunde mit 100 U/ml hCG behandelt, anschließend geerntet und in Lysepuffer aufgenommen. Die Präzipitation erfolgte mit 1 µg Foxo3a Antikörper und 60 µl Protein A-Agarose Beads über Nacht. Das Immunpräzipitat wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit dem Antikörper anti-Acetylated Lysine inkubiert.

4 DISKUSSION

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass das Schwangerschaftshormon Choriogonadotropin Hepatozyten *in vivo* und *in vitro* vor Apoptose schützen kann. Des Weiteren konnten Proteine identifiziert werden, die für diese protektive Wirkung verantwortlich sind. Die Daten geben wichtige Hinweise darauf, warum sich Autoimmunerkrankungen, wie autoimmune Hepatitis, während der Schwangerschaft verbessern und warum sich hCG als Therapie für immunvermittelte Erkrankungen eignen könnte.

4.1 hCG schützt vor akutem und chronischem Leberschaden

Für die Untersuchung, welchen Effekt hCG auf akute und chronische Leberschäden hat, wurden drei verschiedene Leberschädigungsmodelle der Maus verwendet. Für die Induktion eines akuten Leberversagens wurde das Lektin Concanavalin A injiziert. Hierbei handelt es sich um ein weit verbreitetes Mausmodell für Hepatitis, bei dem es zu einer starken Infiltration von T-Zellen und somit zu einem massiven Leberschaden durch Apoptose kommt (Gantner et al., 1995). Die gleichzeitige Behandlung der Mäuse mit hCG führte zu einer signifikanten Reduktion der Transaminase-Werte ALT und AST, die als Indikatoren für Leberschäden verwendet werden. Des Weiteren zeigten TUNEL-Färbungen von Leberschnitten der hCG-behandelten Tiere deutlich weniger apoptotische Zellen. Es wurde vielfach diskutiert, ob der ConA-vermittelte Leberschaden vom CD95/CD95L-System abhängig ist. Dies konnte mittlerweile bestätigt werden, da CD95 und CD95L-defiziente Mäuse nach ConA Behandlung deutlich niedrigere Transaminase Werte aufweisen (Seino et al., 1997), und auch die Vorbehandlung mit CD95 siRNA konnte eine Reduktion der Transaminase Werte bewirken (Song et al., 2003). Watanabe und seine Arbeitsgruppe hingegen vermuten eher eine Beteiligung des Granzyme/Perforin Systems, da in Perforin-defizienten Mäusen ConA kein Leberschaden induziert. Die Behandlung mit einem anti-FasL Antikörper führte in ihrer Studie zu keiner Verbesserung der Leberschädigung (Watanabe et al., 1996).

Hepatozyten exprimieren den CD95-Rezeptor konstitutiv auf ihrer Oberfläche, wodurch sie sehr empfänglich für CD95-vermittelte Apoptose sind. Die Injektion des agonistischen CD95 Antikörpers Jo-2 führt innerhalb weniger Stunden zu einem akuten Leberversagen (Rodriguez et al., 1996). Die Verwendung dieses

Mausmodelles demonstrierte ebenfalls die vielversprechende Wirkung von hCG, da die Transaminase-Werte und die Anzahl an TUNEL-positiven Zellen nach hCG-Behandlung signifikant sanken. Beide Mausmodelle legen den Schluss nahe, dass der protektive Effekt von hCG auf die Hemmung der CD95-vermittelten Apoptose zurückzuführen ist.

Für die Untersuchung, ob hCG nicht nur vor akutem Leberschaden schützt wurde ein chronisches Mausmodell, induziert durch die Gabe von lactosylierten BSA, etabliert. Es konnte beobachtet werden, dass auch in einem chronischen Hepatitis-Modell die Behandlung mit hCG erfolgreich war, da nach acht Wochen die GPT-Werte um die Hälfte sanken und signifikant weniger apoptotische Zellen in der Leber zu finden waren. Ob hCG zu einer vollständigen Heilung der chronischen Hepatitis führen würde, müsste in weiteren Experimenten über einen längeren Zeitraum untersucht werden.

Diese *in vivo* Daten unterstützen Studien, in denen hCG ebenfalls als mögliche Therapie für Autoimmunerkrankungen identifiziert wurde. Li et al. zeigten, dass hCG immunmodulatorische Eigenschaften besitzt und die Entstehung des Sjögren-Syndroms, einer Autoimmunerkrankung der Speichel- und Tränendrüsen, verhindern kann (Li et al., 2007). Des Weiteren wurde von Khan et al. gezeigt, dass hCG NOD Mäuse vor Diabetes, einer Th1-vermittelten Autoimmunerkrankung, schützt. Es führte zur Senkung der Blutzuckerwerte und verhinderte die Infiltration des Bauchspeicheldrüsengewebes mit Immunzellen, indem es die Aktivität der Th1 Zellen hemmte (Khan et al., 2001). In einem Arthritis Modell in Ratten wurde beobachtet, dass eine hCG-Behandlung dosisabhängig die inflammatorische Zellinfiltration sowie die Knochen- und Knorpeldegredation reduzierte (Song et al., 2000). Dies würde im Patienten einer Verbesserung der klinischen Symptome entsprechen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass hCG für die Behandlung von akuten und chronischen Autoimmunerkrankungen von entscheidender Bedeutung werden könnte.

4.2 hCG hemmt Apoptose in primären Maus- und Humanhepatozyten

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass hCG auch *in vitro* sowohl Maus- als auch humane Hepatozyten vor der CD95-vermittelten Apoptose schützt. In dem Experiment wurden Zellen mit agonistischen CD95 Antikörpern und hCG

behandelt. Es zeigte sich eine vollständige Hemmung der Apoptose in humanen Hepatozyten und in primären Maushepatozyten, die durch eine deutliche Verbesserung der Zellvitalität nach hCG Behandlung gekennzeichnet war.

Es ist bekannt, dass das CD95/CD95L System ein wichtiger Apoptose-Signalweg für die lokale Immuntoleranz während und nach der Einnistung des Trophoblasten in die Gebärmutterschleimhaut ist (Kauma et al., 1999). In diesem Fall führt hCG in endometrialen Zellen aber zu einer abnehmenden Zellvitalität und zu einem Anstieg von Apoptose. In Kokulturrexperimenten induzierten hCG-behandelte, endometriale Zellen in T-Zellen Apoptose und es konnte eine erhöhte Expression des FasL in diesen Zellen gefunden werden. hCG ermöglicht demnach die Implantation des Trophoblasten, indem dort proapoptotische Moleküle hoch reguliert, die zur Eliminierung autoaggressiver T-Zellen führen (Kayisli et al., 2003).

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit Kokulturrexperimente mit Peptid-beladenen primären humanen Hepatozyten und gegen das Peptid gerichtete T-Zellen durchgeführt. Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit hCG führte zu einem erfolgreichen Schutz der Hepatozyten vor Apoptose durch zytotoxische T-Zellen.

Diese Ergebnisse unterstützen die Beobachtungen, warum sich eine Reihe von Autoimmunerkrankungen während der Schwangerschaft verbessern, da hCG die maternale Immuntoleranz steigert und gleichzeitig vor der Gewebeerstörung von Organen wie die Leber schützt, indem es die Zytotoxizität durch T-Zellen herabsetzt. Dieser „gewebespezifische Effekt“ zeichnet hCG als mögliche Therapie von autoimmuner Hepatitis aus.

4.3 hCG verhindert die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-16 und die Einwanderung von T-Zellen in die Leber

Der T-Zell vermittelte Leberschaden ist ein wichtiger pathophysiologischer Prozeß der autoimmunen Hepatitis. Aus diesem Grund wurden für die Analyse des durch ConA, Jo-2 und IacBSA geschädigten Lebergewebes Kryoschnitte hergestellt und auf eingewanderte T-Zellen untersucht. Dies erfolgte, indem die CD4⁺ T-Zellen mit einem rot fluoreszierenden anti-CD4 Antikörper gefärbt wurden. In allen drei Mausmodellen konnte die Infiltration von CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden und es konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass in das Lebergewebe der hCG-behandelten Mäuse erheblich weniger CD4⁺ T-Zellen eingewandert waren. Dies deckt sich mit Beobachtungen in einem Arthritis-Modell in Ratten, bei dem hCG die Zellinfiltration unterdrückte (Song et al., 2000).

Für eine inflammatorische Antwort in einer geschädigten Leber ist die Ausschüttung von Zytokinen wichtig, um die Immunreaktion zu koordinieren. Deshalb wurde das Zytokinprofil im Serum von Tieren im akuten ConA- und chronischen lacBSA-Modell verglichen. Das einzige Zytokin, das bei beiden Modellen induziert und nach hCG-Behandlung deutlich reduziert war, konnte als das CD4⁺-Zell-spezifische Chemotaxin IL-16 identifiziert werden. Weitere Zytokine wie z.Bsp. TNF α , IL6, MIP-1 waren zwar in dem Serum der ConA Mäuse stark hochreguliert, zeigten jedoch in den hCG-behandelten Tieren in diesem Autoimmun-Modell mit Leberschaden keine Veränderung. In einem Arthritis Modell konnten Song et al. hingegen zeigen, dass hCG die übermäßige Produktion der Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β unterdrückt (Song et al., 2000). Dies verdeutlicht den immunsuppressiven Effekt von hCG, da die Ausschüttung von proinflammatorischen Signalen reduziert wird.

IL-16 spielt in der Entwicklung von verschiedenen Th-1-vermittelten Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle und es eignet sich, um das Fortschreiten von Autoimmunerkrankungen zu beobachten (Prince, 2005). Dies konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden, da in den Seren von Patienten mit autoimmuner Hepatitis erhöhte IL-16 Konzentrationen gefunden wurden. IL-16 wird zunächst als ein Vorläufermolekül synthetisiert und erst durch Caspase-3, eine der zentralen Effektorcaspasen der Apoptose, in die aktive Form gespalten. Aus diesem Grund wurde in den Überständen von primären humanen Hepatozyten, die mit dem agonistischen CD95-Antikörper APO-1 und hCG behandelt wurden, die Aktivität von Caspase-3 und die IL-16 Konzentration gemessen. Passend zu der Reduktion von IL-16 im Serum hCG behandelter Mäuse, konnte auch hier eine signifikant geringere Caspase-3 Aktivität und eine niedrigere IL-16 Konzentration unter dem Einfluss von hCG nachgewiesen werden. Dies könnte erklären, warum hCG zu einer Verbesserung von Leberschäden führt, da in Folge der Herunterregulation von IL-16 und Caspase-3 auch weniger CD4⁺ T-Zellen das Gewebe infiltrieren. Dazu wurde in dieser Arbeit ein interessanter Migrations-Versuch durchgeführt. In primären Maus- und Humanhepatozyten wurde mit den agonistischen CD95-Antikörpern Apoptose induziert, wodurch es zu einer erhöhten Migration von CD4⁺ Zellen gekommen ist, die durch hCG unterbunden wurde.

4.4 hCG-Wirkung wird über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg vermittelt

Nachdem gezeigt werden konnte, dass hCG effektiv vor Leberschäden schützte, wurde der Signalweg von hCG untersucht. Es ist bekannt, dass hCG an der Zelloberfläche den LH/CG-Rezeptor bindet, wodurch es zur Aktivierung von G-Proteinen kommt, die für die Weiterleitung des Signals ins Zellinnere sorgen (Myers et al., 2000). Die GTPase Aktivität der G-Proteine führt zur Aktivierung der Adenylatzyklase, die cAMP synthetisiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hCG auf Zellen in der Leber wirkt, da in der Leber und in den Hepatozyten die cAMP Konzentration stark anstieg, wohingegen in der Milz und in den CD4⁺ Zellen nur eine geringe cAMP-Bildung nachweisbar war. Daraufhin wird die cAMP-abhängige Proteinkinase A aktiviert, was durch Inhibitorexperimente belegt werden konnte. cAMP und die Proteinkinase A aktivieren das Proto-Onkogen Ras (Tsygankova et al., 2000). Dieses scheint auch im hCG-Signalweg eine wichtige Rolle zu spielen, was durch einen Ras-Aktivitätsassay und durch Verwendung des Ras Inhibitors Manumycin in murinen und humanen Hepatozyten deutlich gezeigt werden konnte. Ras führt zur direkten Stimulierung der PI3-Kinase (Rodriguez-Viciano et al., 1997), die über die Aktivierung von Akt (Proteinkinase B) Signalwege, die das Überleben von Zellen sichern, einleitet (Downward, 1997). Auch die Hemmung der PI3-Kinase führte in den Hepatozyten zu einer Hemmung des antiapoptotischen Effektes von hCG.

Die Analyse der Akt Aktivität in primären humanen Hepatozyten, CD4⁺-, CD8⁺-Zellen und Monozyten zeigte nur in Hepatozyten eine deutliche Erhöhung der Akt-Phosphorylierung. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass hCG primär in den Hepatozyten wirkt und die Aktivität der Immunzellen eher indirekt über die Modulation von Zytokinen reguliert wird.

4.5 hCG schützt vor Apoptose durch Regulation des Transkriptionsfaktors Foxo3a und seiner Zielgene Bim und Puma

Die Analyse hCG-regulierter Genexpressionsprofile mit Hilfe von DNA-Microarray-Technologie wies auf eine deutliche Herunterregulation des proapoptotischen Gens Puma hin (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis konnte mit Real Time PCR und Western Blot bestätigt werden, wobei eine zusätzliche Herunterregulation des Bcl-2 Proteins Bim gefunden wurde. Bim spielt für Apoptose in vielen Zelltypen eine wichtige Rolle (Huang und Strasser, 2000), indem es an anti-apoptotische Bcl-2

Mitglieder bindet. Kaufmann et al. zeigten, dass Bim- und Bid-defiziente Mäuse gegenüber LPS-induzierter Hepatitis resistent sind. Auch im ConA Modell weisen Bim-defiziente Mäuse niedrigere Transaminase-Werte auf (Kaufmann et al., 2009). Diese Studie unterstützt Beobachtungen aus dieser Arbeit, da hCG vor ConA-induziertem Leberschaden schützt und dies scheinbar auf die Herunterregulation der proapoptischen Proteine Bim und Puma zurückzuführen ist.

Bim und Puma sind Zielgene des Transkriptionsfaktors Foxo3a, die als Stressantwort auf den Entzug von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren hochreguliert werden (You et al., 2006). In dieser Arbeit konnte Foxo3a als wichtiges Schlüsselgen im hCG Signalweg identifiziert werden. Immunhistologische Untersuchungen zur zellulären Lokalisation verschiedener Foxo3a Konstrukte mit Mutationen der Akt-Phosphorylierungsstellen und der DNA-Bindedomäne zeigten eindrucksvoll, dass hCG über die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges zur Phosphorylierung von Foxo3a und dessen Transport aus dem Zellkern führt. Des Weiteren unterstützen Promotorstudien die Vermutung, dass hCG Akt-abhängig die transkriptionelle Aktivität von Foxo3a hemmt.

Foxo3a ist in verschiedene Signalwege integriert, die Apoptose, Seneszenz und die Lebenserwartung während oxidativem Stress regulieren (Maiese et al., 2008). Dieses Wissen macht Foxo3a zu einem interessanten Zielgen für die Therapie von verschiedenen Erkrankungen. Es gibt einige Studien, in denen in Zellkultur- oder Tierexperimenten gezeigt werden konnte, dass die Inhibition oder der „Knockdown“ von Foxo3a zur Verbesserung von unterschiedlichen Krankheitsbildern führt. So zeigten Won et al., dass die Phosphorylierung von Foxo3a durch Estradiol Ratten vor Gehirnschäden, bedingt durch einen Schlaganfall, schützt (Won et al., 2006). Des Weiteren spielt die Hemmung von Foxo3a durch Nicotinamid für das Überleben von primären hippocampalen Neuronen eine Rolle, was für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen interessant ist (Chong et al., 2004). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Modulierung und Inaktivierung von Foxo3a durch hCG ein neuer, sehr viel versprechender Ansatz für die Therapie von Leber- und Autoimmunerkrankungen ist.

4.6 hCG aktiviert das Langlebigkeitsprotein Sirt1

Eine weitere zentrale Rolle im hCG-Signalweg in Verbindung mit Foxo3a spielt das Langlebigkeitsprotein Sirt1. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von Sirt1 dosisabhängig den protektiven Effekt von hCG verhindert. Unter Stressbedingungen bildet Sirt1 im Zellkern einen Komplex mit Foxo3a und führt zu dessen Deacetylierung, wodurch die durch Foxo3a-induzierte Apoptose gehemmt wird (Brunet et al., 2004). Immunpräzipitationsanalysen in primären humanen Hepatozyten zeigten, dass hCG zu einer Deacetylierung von Foxo3a führt, wodurch die Hemmung der Foxo3a Aktivität zusätzlich zur Phosphorylierung durch Akt erklärt werden könnte. Es konnte beobachtet werden, dass es nach hCG-Behandlung *in vivo* und *in vitro* zur Phosphorylierung von Sirt1 kommt und dass hCG eine Akkumulation von Phospho-Sirt1 im Zellkern bewirkt. Der nucleo-zytoplasmatische Transport ist sehr wichtig für die Funktion von Sirt1. Tanno et al zeigten, dass die nukleäre Lokalisation von Sirt1 die zelluläre Resistenz gegenüber Apoptose erhöht und die Inhibition der PI3-Kinase die zytoplasmatische Lokalisation von Sirt1 in unstimulierten C2C12 Zellen (prämyoblastische Vorläuferzelllinie) induziert (Tanno et al., 2007). Diese Ergebnisse stützen die Beobachtungen aus dieser Arbeit, da hCG über den PI3Kinase/Akt-Signalweg zur Phosphorylierung und zum Transport von Sirt1 in den Zellkern führt, wodurch Apoptose gehemmt wird. Dieser Mechanismus eröffnet neue Perspektiven für die Behandlung von Krankheiten, indem die Aktivität von Sirt1 erhöht und somit Apoptose unterdrückt und das Überleben der Zelle gesichert wird. Aus diesem Grund ist man auf der Suche nach Aktivatoren von Sirt1, die vom Körper gut toleriert werden und keine Nebenwirkungen haben. Resveratrol ist schon länger als Aktivator von Sirt1 bekannt und trägt auch zu einer verlängerten Lebensdauer von Mäusen bei. Die positive Wirkung ist jedoch nur in adipösen Mäusen beobachtet worden und ob Sirt1 wirklich als primäres Ziel von Resveratrol gilt, ist noch umstritten (Agarwal und Bauer, 2011; Pacholec et al., 2010). Ein weiterer Aktivator von Sirt1 ist die chemische Substanz Srt1720, welche in Mäusen die Fettverbrennung anregt und die Blut- und Cholesterinwerte senkt (Feige et al., 2008). Srt1720 wurde aber bisher noch nicht in klinischen Studien im Menschen eingesetzt, so dass noch keine Daten über die Verträglichkeit und die Nebenwirkungen dieser Substanz vorliegen. hCG hingegen ist seit Jahren das am meist verwendete Medikament, um die Follikelreifung in Patienten mit Unfruchtbarkeit auszulösen. Aus diesem Grund gibt es zahlreiche Daten zur Toxizität von hCG, die

belegen, dass hCG vom Körper gut toleriert wird und keine schweren Nebeneffekte auftreten (Ludwig et al., 2003).

Auch für Fettlebererkrankungen, wie die nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH), die Steatofibrose und die Zirrhose könnte der Einsatz eines Sirt1 Aktivators wie hCG das Mittel der Wahl werden. In Nagetieren, die einer fettreichen Diät ausgesetzt sind, spielt Sirt1 eine wichtige Rolle für die hepatische Steatose. Eine erhöhte Sirt1 Expression schützt Mäuse vor einer Steatose, wohingegen eine niedrige Expression die Empfänglichkeit der Mäuse gegenüber der Steatose erhöht (Kelly, 2010b). Dies konnte unter anderem in DBC-1-defizienten Mäusen gezeigt werden. DBC-1 („deleted in breast cancer-1) ist ein negativer Regulator von Sirt-1 und dessen „Knockdown“ führt in einigen Organen, wie auch der Leber, zu einer erhöhten Sirt1 Aktivität. Unterziehen sich diese Mäuse einer fettreichen Diät, entwickeln sie keine Steatohepatitis (Escande et al., 2010). Aufgrund dieser Ergebnisse und den Daten aus dieser Arbeit könnte hCG als Sirt1-Aktivator zu einer Verbesserung von Fettlebererkrankungen führen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass hCG die Langlebigkeitsproteine Foxo3a und Sirt1, die eine zentrale Rolle für die Lebensdauer von Zellen spielen, reguliert, könnte hCG nicht nur für die Therapie von akuten und chronischen Lebererkrankungen, sondern auch für andere chronische Autoimmun- und Entzündungskrankheiten eingesetzt werden. Dies könnte anhand weiterer krankheitsrelevanter Tiermodelle untersucht werden.

4.7 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte in Mausmodellen zur T-Zell-abhängigen Hepatitis gezeigt werden, dass das Schwangerschaftshormon hCG gewebeprotective und antiinflammatorische Eigenschaften besitzt und sich deshalb für die Therapie von autoimmuner Hepatitis und anderen entzündlichen Lebererkrankungen eignen könnte. Es wurde sowohl ein möglicher Signalweg von hCG in primären Hepatozyten aufgeklärt als auch der Einfluss auf das Immunsystem näher betrachtet. Dabei stellte sich heraus, dass nach der Bindung an den LH/CG-Rezeptor der PI3K/Akt-Signalweg aktiviert wird, wodurch es zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Foxo3a durch Akt und somit zu dessen Inaktivierung durch Ausschluss aus dem Zellkern kommt. Zusätzlich hemmt das Langlebigkeitsprotein Sirt1 die Aktivität von Foxo3a, indem es das Protein deacetyliert. Dadurch werden die durch Foxo3a

regulierten proapoptotischen Gene Bim und Puma nicht mehr transkribiert und es kommt zu einer deutlichen Senkung der Apoptoserate.

Außerdem führt hCG zu einer verminderten Aktivität der Effektorcaspase-3, die unter anderem für die Spaltung des chemotaktischen Faktors IL-16 in seine biologisch aktive Form verantwortlich ist. Dies bewirkt eine Senkung der IL-16 Konzentration im Serum, wodurch weniger CD4⁺ T-Zellen angelockt werden, welche das Gewebe infiltrieren können. Dadurch wird die Leber zusätzlich vor Zerstörung des Gewebes durch autoaggressive T-Zellen geschützt.

In dieser Studie wurde bewiesen, dass die Deacetylase Sirt1 eine essentielle Rolle für die antiapoptotische Wirkung von hCG spielt. Auch viele andere Studien zeigten in der Vergangenheit, dass die Modulation von Sirt1 einen Einfluss auf eine Reihe altersabhängiger Krankheiten, wie Diabetes, Krebs, sowie kardiovaskuläre, inflammatorische und neurodegenerative Krankheiten hat (Donmez und Guarante, 2010). Aus diesem Grund sollte die Bedeutung von Sirt1 für den Effekt von hCG im Fokus weiterer Untersuchungen stehen. Für *in vivo* Studien stehen bereits konditionale Knockout-Mäuse für Sirt1 in der Leber und CD4⁺ T-Zellen zur Verfügung. Im ConA-Modell wäre interessant zu untersuchen, ob die protektive Wirkung von hCG in diesen Mäusen gehemmt werden kann. Des Weiteren könnte das Ausschalten von Sirt1 durch die Verwendung von siRNA noch mehr Aufschluss über den Signalweg und Wirkmechanismus von hCG geben.

Im Hinblick auf die Senkung der IL-16 Konzentration nach hCG Behandlung und der Tatsache, dass in Patientenseren mit autoimmuner Hepatitis, NASH, HBV, und HCV IL-16 stark erhöht ist, wäre eine Bestimmung des IL-16 Gehaltes in Patientenseren mit anderen Autoimmun- oder Inflammationskrankheiten sinnvoll. Dies wäre ein weiterer Hinweis darauf, dass hCG auch für andere Krankheiten durch seine gewebeprotectiven und entzündungshemmenden Eigenschaften von Bedeutung sein könnte.

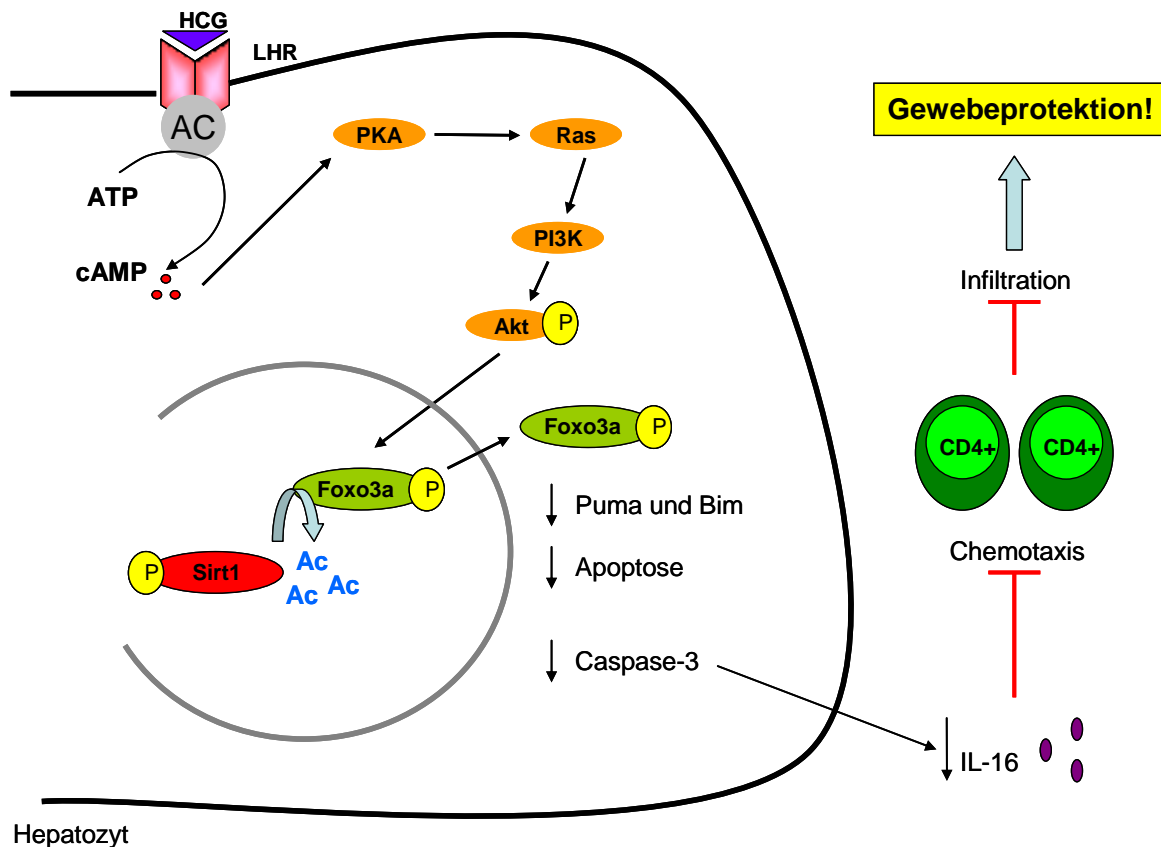


Abb. 35 Signalweg und Wirkmechanismus von hCG in Hepatozyten

hCG bindet an den LHCG-Rezeptor, wodurch es zu einer Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges kommt. Der Transkriptionsfaktor Foxo3a wird dann zum einen durch Phosphorylierung von Akt und zum anderen durch Deacetylierung durch Sirt1 inaktiviert. Dies führt zu einer Herunterregulation der proapoptischen Gene Puma und Bim und dadurch zu einer Hemmung von Apoptose. Des Weiteren bewirkt hCG eine geringere Aktivität der Effektor Caspase-3, die IL-16 in die biologisch aktive Form spaltet. Eine niedrigere IL-16 Konzentration führt zu einer verminderten Chemotaxis von CD4+ Zellen und somit zu weniger infiltrierten CD4+ Zellen in die Leber, wodurch das Gewebe vor einer Zerstörung geschützt wird.

5 LITERATURVERZEICHNIS

Adachi M, Suematsu S, Suda T, Watanabe D, Fukuyama H, Ogasawara J, Tanaka T, Yoshida N, Nagata S. (1996) Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 2131-6.

Agarwal B, Baur JA. (2011) Resveratrol and life extension. *Ann N Y Acad Sci.* 1215, 138-43.

Aggarwal N, Chopra S, Suri V, Sikka P, Dhiman RK, Chawla Y. (2010) Pregnancy outcome in women with autoimmune hepatitis. *Arch Gynecol Obstet.* 2010 Jun 25.

Akoum A, Metz CN, Morin M. (2005) Marked increase in macrophage migration inhibitory factor synthesis and secretion in human endometrial cells in response to human chorionic gonadotropin hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 90, 2904-10.

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. (2005) Tolerance, suppression and the fetal allograft. *J Mol Med.* 83, 88-96.

Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Büschenfelde KH, Zeniya M, et al. (1999) International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 31, 929-38.

Antignani A, Youle RJ. (2006) How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr Opin Cell Biol.* 18, 685-9.

Asherson GL, Ferluga J, Janossy G. (1973) Non-specific cytotoxicity by T cells activated with plant mitogens in vitro and the requirement for plant agents during the killing reaction. *Clin Exp Immunol.* 15, 573-89.

Biddison WE, Taub DD, Cruikshank WW, Center DM, Connor EW, Honma K. (1997) Chemokine and matrix metalloproteinase secretion by myelin proteolipid protein-specific CD8+ T cells: potential roles in inflammation. *J Immunol.* 158, 3046-53.

Biggs WH 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC. (1999) Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 7421-6.

Birkenkamp KU, Coffey PJ. (2003) Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochem Soc Trans.* 31, 292-7.

Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Köntgen F, Adams JM, Strasser A. (1999) Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science.* 286, 1735-8.

- Borgerson KL, Bretz JD, Baker JR Jr. (1999) The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid autoimmune disease. *Autoimmunity*. 30, 251-64.
- Brenner D, Krammer PH, Arnold R. (2008) Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hematol*. 66, 52-64.
- Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 96, 857-68.
- Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol*. 11, 297-305.
- Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, Dalal SN, DeCaprio JA, Greenberg ME, Yaffe MB. (2002) 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol*. 156, 817-28.
- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME. (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*. 303, 2011-5.
- Buchel E, Van Steenbergen W, Nevens F, Fevery J. (2002) Improvement of autoimmune hepatitis during pregnancy followed by flare-up after delivery. *Am J Gastroenterol*. 97, 3160-5.
- Burgering BM, Kops GJ. (2002) Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem Sci*. 27, 352-60.
- Butler SA, Staite EM, Iles RK. (2003) Reduction of bladder cancer cell growth in response to hCGbeta CTP37 vaccinated mouse serum. *Oncol Res.*, 14, 93-100.
- Cadd G, McKnight GS. (1989) Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain. *Neuron*. 3, 71-9.
- Czaja AJ, Manns MP. (2010) Advances in the diagnosis, pathogenesis, and management of autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*, 139, 58-72.
- Chong ZZ, Lin SH, Maiese K. (2004) The NAD⁺ precursor nicotinamide governs neuronal survival during oxidative stress through protein kinase B coupled to FOXO3a and mitochondrial membrane potential. *J Cereb Blood Flow Metab*. 24, 728-43.
- Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA. (2004) Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*. 305, 390-2.
- Cole LA, Khanlian SA, Riley JM, Butler SA. (2006) Hyperglycosylated hCG in gestational implantation and in choriocarcinoma and testicular germ cell malignancy tumorigenesis. *J Reprod Med.*, 51, 919-29.

- Cole LA, Sasaki Y, Muller CY. (2007) Normal production of human chorionic gonadotropin in menopause. *N Engl J Med.*, 356, 1184-6.
- Cole LA. (2010) Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reprod Biol Endocrinol.* 8, 102.
- Cory S, Adams JM.(2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2, 647-56.
- Cruikshank WW, Berman JS, Theodore AC, Bernardo J, Center DM. (1987) Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes. *J Immunol.*138, 3817-23.
- Cruikshank W, Little F. (2008) Interleukin-16: the ins and outs of regulating T-cell activation. *Crit Rev Immunol.* 28, 467-83.
- Cummings DE, Brandon EP, Planas JV, Motamed K, Idzerda RL, McKnight GS. (1996) Genetically lean mice result from targeted disruption of the RII beta subunit of protein kinase A. *Nature.* 382, 622-6.
- Dai JM, Wang ZY, Sun DC, Lin RX, Wang SQ. (2007) SIRT1 interacts with p73 and suppresses p73-dependent transcriptional activity. *J Cell Physiol.* 210, 161-6.
- Danial NN, Korsmeyer SJ. (2004) Cell death: critical control points. *Cell.* 116, 205-19.
- De Medeiros SF, Norman RJ. (2009) Human choriogonadotrophin protein core and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights. *Hum Reprod Update.*15, 69-95.
- Di Marco R, Xiang M, Zacccone P, Leonardi C, Franco S, Meroni P, Nicoletti F. (1999) Concanavalin A-induced hepatitis in mice is prevented by interleukin (IL)-10 and exacerbated by endogenous IL-10 deficiency. *Autoimmunity.* 31, 75-83.
- Donmez G, Guarente L. (2010) Aging and disease: Connections to sirtuins. *Aging Cell.* 9, 285-90.
- Downward J. (1998) Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol.* 10, 262-7.
- Dudley DJ, Chen C-L, Murray MD, Daynes RA, Araneo BA. (1993) Adaptive immune responses during murine pregnancy: pregnancy-induced regulation of lymphokine production by activated T lymphocytes. *Am J Obstet Gynecol* 168, 1155–1163.
- Elssner A, Doseff AI, Duncan M, Kotur M, Wewers MD. (2004) IL-16 is constitutively present in peripheral blood monocytes and spontaneously released during apoptosis. *J Immunol.*172, 7721-5.
- Escande C, Chini CC, Nin V, Dykhouse KM, Novak CM, Levine J, van Deursen J, Gores GJ, Chen J, Lou Z, Chini EN. (2010) Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice. *J Clin Invest.*120, 545-58.

- Eyster KM, Stouffer RL (1985). Adenylate cyclase in the corpus luteum of the rhesus monkey. II. Sensitivity to nucleotides, gonadotropins, catecholamines, and nonhormonal activators. *Endocrinology*. 116, 1552-8.
- Farghali H, Masek K (1998) Immunopharmacologic agents in the amelioration of hepatic injuries. *Int J Immunopharmacol*. 20, 125-39.
- Fei M, Zhao Y, Wang Y, Lu M, Cheng C, Huang X, Zhang D, Lu J, He S, Shen A. (2009) Low expression of Foxo3a is associated with poor prognosis in ovarian cancer patients. *Cancer Invest*. 27, 52-9.
- Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, Lambert PD, Matakis C, Elliott PJ, Auwerx J. (2008) Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab*. 8, 347-58.
- Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ. (2003) Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *J Hepatol*. 39, 978-83.
- Finkelsztejn A, Brooks JB, Paschoal FM Jr, Fragoso YD. (2011) What can we really tell women with multiple sclerosis regarding pregnancy? A systematic review and meta-analysis of the literature. *BJOG*. 118, 790-7.
- Fox CK, Furtwaengler A, Nepomuceno RR, Martinez OM, Krams SM. (2001) Apoptotic pathways in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Liver*. 21, 272-9.
- French LE, Tschopp J. (2003) Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Differ*. 10, 117-23.
- Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, Mori N. (2000) Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J*. 349, 629-34.
- Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, Krammer PH, Runkel L. (1995) Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med*. 182, 1223-30.
- Galle PR, Krammer PH. (1998) CD95-induced apoptosis in human liver disease. *Semin Liver Dis*. 18, 141-51.
- Gantner F, Leist M, Lohse AW, Germann PG, Tiegs G. (1995) Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology*. 21, 190-8.
- Gates A, Hohenester S, Anwer MS, Webster CR. (2009) cAMP-GEF cytoprotection by Src tyrosine kinase activation of phosphoinositide-3-kinase p110 β/α in rat hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 296, 764-74.

- Giannakou ME, Goss M, Jünger MA, Hafen E, Leervers SJ, Partridge L. (2004) Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science*. 305, 361.
- Glucksmann A. (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 26, 59-81
- Griffith TS, Yu X, Herndon JM, Green DR, Ferguson TA. (1996) CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity*. 5, 7-16.
- Guicciardi ME, Gores GJ.(2005) Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut*. 54, 1024-33.
- Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty, Balkundi D, Padbury J, Sharma S (2000) Gestational agedependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissue. *J Immunol*. 164, 5721-8.
- Harada K, Shimoda S, Sato Y, Isse K, Ikeda H, Nakanuma Y.(2009) Periductal interleukin-17 production in association with biliary innate immunity contributes to the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol*. 157, 261-70.
- Henderson ST, Johnson TE. (2001) daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*. 11, 1975-80.
- Herranz D, Muñoz-Martin M, Cañamero M, Mulero F, Martinez-Pastor B, Fernandez-Capetillo O, Serrano M. (2010) Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun*. 1, 1-8.
- Hessel EM, Cruikshank WW, Van Ark I, De Bie JJ, Van Esch B, Hofman G, Nijkamp FP, Center DM, Van Oosterhout AJ. (1998) Involvement of IL-16 in the induction of airway hyper-responsiveness and up-regulation of IgE in a murine model of allergic asthma. *J Immunol*.160, 2998-3005.
- Hessel EM, Cruikshank WW, Van Ark I, De Bie JJ, Van Esch B, Hofman G, Nijkamp FP, Center DM, Van Oosterhout AJ. (1998) Involvement of IL-16 in the induction of airway hyper-responsiveness and up-regulation of IgE in a murine model of allergic asthma. *J Immunol*.160, 2998-3005.
- Hirakawa T and Ascoli M. (2003) A Constitutively Active Somatic Mutation of the Human Lutropin Receptor Found in Leydig Cell Tumors Activates the Same Families of G Proteins as Germ Line Mutations Associated with Leydig Cell Hyperplasia. *Endocrinology*. 144, 3872-8.
- Holz LE, Bowen DG, Bertolino P. (2010) Mechanisms of T cell death in the liver: to Bim or not to Bim? *Dig Dis*. 28, 14-24.
- Hosaka T, Biggs WH 3rd, Tieu D, Boyer AD, Varki NM, Cavenee WK, Arden KC (2004) Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 2975-80.

- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 425, 191-6.
- Huang DC, Strasser A. (2000) BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*. 103, 839-42.
- Huang H, Tindall DJ (2007) Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci*. 120, 2479-2487.
- Huynh H. (1998) In vivo regulation of the insulin-like growth factor system of mitogens by human chorionic gonadotropin. *Int J Oncol*.13, 571-575.
- Jeschke U, Briese V, Friese K, Reimer T, Richter DU. (2001) Stimulierung der hCG Protein- und mRNA-Expression in isolierten Trophoblastzellen. *Journal für Fertilität und Reproduktion*. 11, 6-11.
- Kaaja RJ, Greer IA.(2005) Manifestations of chronic disease during pregnancy. *JAMA*. 294, 2751-7.
- Kaeberlein M, McVey M, Guarente L (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev*.13, 2570-80.
- Kaser A, Dunzendorfer S, Offner FA, Ryan T, Schwabegger A, Cruikshank WW, Wiedermann CJ, Tilg H (1999) A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells. *J Immunol*. 1999 163,3232-8.
- Kaufmann T, Jost PJ, Pellegrini M, Puthalakath H, Gugasyan R, Gerondakis S, Cretney E, Smyth MJ, Silke J, Hakem R, Bouillet P, Mak TW, Dixit VM, Strasser A. (2009) Fatal hepatitis mediated by tumor necrosis factor TNFalpha requires caspase-8 and involves the BH3-only proteins Bid and Bim. *Immunity*. 30, 56-66.
- Kauma, S. W., T. F. Huff, N. Hayes, A. Nilkaeo. (1999) Placental Fas ligand expression is a mechanism for maternal immune tolerance to the fetus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*,2188.
- Kayisli UA, Selam B, Guzeloglu-Kayisli O, Demir R, Arici A. (2003) Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system. *J Immunol*. 171, 2305-13.
- Kelly G. (2010) A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 1. *Altern Med Rev*. 15, 245-63.
- Kelly GS. (2010) A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 2. *Altern Med Rev*. 15, 313-28.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26, 239-57.

- Khan NA, Khan A, Savelkoul HF, Benner R. (2001) Inhibition of diabetes in NOD mice by human pregnancy factor. *Hum Immunol.* 62, 1315-23.
- Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH. (1993) Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol.* 5, 625-30.
- Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM. (1999) Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature.* 398, 630-4.
- Kurtzman JT, Wilson H, Rao CV. (2001) A proposed role for hCG in clinical obstetrics. *Semin Reprod Med.* 19,63-8.
- Krammer PH. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 407, 789-95.
- Krammer PH, Kamiński M, Kiessling M, Gülow K. (2007) No life without death. *Adv Cancer Res.* 97,111-38.
- Ksontini R, Colagiovanni DB, Josephs MD, Edwards CK 3rd, Tannahill CL, Solorzano CC, Norman J, Denham W, Clare-Salzler M, MacKay SL, Moldawer LL. (1998) Disparate roles for TNF-alpha and Fas ligand in concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol.* 160, 4082-9.
- Küsters S, Gantner F, Künstle G, Tiegs G. (1996) Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. *Gastroenterology.* 111, 462-71.
- Küsters S, Tiegs G, Alexopoulou L, Pasparakis M, Douni E, Künstle G, Bluethmann H, Wendel A, Pfizenmaier K, Kollias G, Grell M. (1997) In vivo evidence for a functional role of both tumor necrosis factor (TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis. *Eur J Immunol.* 27, 2870-5.
- Laberge S, Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM. . (1995) Histamine-induced secretion of lymphocyte chemoattractant factor from CD8+ T cells is independent of transcription and translation. Evidence for constitutive protein synthesis and storage. *J Immunol.* 155, 2902-10.
- Laberge S, Ernst P, Ghaffar O, Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM, Hamid Q (1997) Increased expression of interleukin-16 in bronchial mucosa of subjects with atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 17, 193-202.
- Laberge S and Cruikshank WW. (2008) Derivatives of IL-16 to Modulate Airway Inflammation. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 7, 281-293.
- Langley E, Pearson M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG, Kouzarides T. (2002) Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J.* 21, 2383-96.

- Lard LR, Roep BO, Verburgh CA, Zwinderman AH, Huizinga TW (2002) Elevated IL-16 levels in patients with systemic lupus erythematosus are associated with disease severity but not with genetic susceptibility to lupus. *Lupus*.11, 181-5.
- Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, Yang Y, Villén J, Becker EB, DiBacco S, de la Iglesia N, Gygi S, Blackwell TK, Bonni A. (2006) A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell*. 125, 987-1001.
- Lei Z.M., Taylor D.D., Gercel-Taylor C. and Rao C.V. (1999) Human Chorionic Gonadotropin Promotes Tumorigenesis of Choriocarcinoma JAR Cells. *Trophoblast Research* 13, 147-159
- Li N, Shigihara T, Tzioufas AG, Notkins AL, Yoon JW, Jun HS. (2007) Human chorionic gonadotropin prevents Sjögren's syndrome-like exocrinopathy in mice. *Arthritis Rheum*. 56, 2211-5.
- Li M, Wang X, Meintzer MK, Laessig T, Birnbaum MJ, Heidenreich KA (2000) Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol* 20, 9356–63.
- Licht P, Fluhr H, Neuwinger J, Wallwiener D, Wildt L. (2007) Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? *Mol Cell Endocrinol*. 269, 85-92.
- Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG, Evan GI. (1995) A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res*. 23, 1686-90.
- Lima MH, Souza LC, Caperuto LC, Bevilacqua E, Gasparetti AL, Zanuto R, Saad MJ, Carvalho CR. (2006) Up-regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in the ovary of rats by chronic treatment with hCG and insulin. *J Endocrinol*. 190, 451-9.
- Longhi MS, Meda F, Wang P, Samyn M, Mieli-Vergani G, Vergani D, Ma Y. (2008) Expansion and de novo generation of potentially therapeutic regulatory T cells in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 47, 581-91.
- Ludwig M, Doody KJ, Doody KM. (2003) Use of recombinant human chorionic gonadotropin in ovulation induction. *Fertil Steril*. 79, 1051-9.
- MacFarlane M, Williams AC.(2004) Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep*. 5, 674-8.
- Maciaszek JW, Parada NA, Cruikshank WW, Center DM, Kornfeld H, Viglianti GA. (1997) IL-16 represses HIV-1 promoter activity. *J Immunol*. 158, 5-8.
- Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. (2008) OutFOXOing disease and disability: the therapeutic potential of targeting FoxO proteins. *Trends Mol Med*.14, 219-27.

- McBurney MW, Yang X, Jardine K, Hixon M, Boekelheide K, Webb JR, Lansdorp PM, Lemieux M. (2003) The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Mol Cell Biol.* 23, 38-54.
- Michan S, Sinclair D. (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J.* 404, 1-13.
- Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. (2005) Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell.* 16, 4623-35.
- Mizuhara H., O'Neill E., Seki N., Ogawa T., Kusunoki C., Otsuka K., Satoh S., Niwa M., Senoh H., Fujiwara H. (1994). T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *J Exp Med.* 179, 1529-37.
- Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L. (2004) Mammalian SIRT1 Represses Forkhead Transcription Factors. *Cell* 116, 551-563.
- Myers RV, Wang Y, Moyle WR. (2000) The surface of alpha-subunit loop 1 distant from the subunit interface is exposed in the hCG lutropin receptor complex. *Biochim Biophys Acta.* 1475, 390-4.
- Nagata S. (1998) Human autoimmune lymphoproliferative syndrome, a defect in the apoptosis-inducing Fas receptor: a lesson from the mouse model. *J Hum Genet.* 43, 2-8.
- Nakae J, Barr V, Accili D. (2000) Differential regulation of gene expression by insulin and IGF-1 receptors correlates with phosphorylation of a single amino acid residue in the forkhead transcription factor FKHR. *EMBO J.* 19, 989-96.
- Napper AD, Hixon J, McDonagh T, Keavey K, Pons JF, Barker J, Yau WT, Amouzegh P, Flegg A, Hamelin E, Thomas RJ, Kates M, Jones S, Navia MA, Saunders JO, DiStefano PS, Curtis R. (2005) Discovery of indoles as potent and selective inhibitors of the deacetylase SIRT1. *J Med Chem.* 48, 8045-54.
- Natori S, Rust C, Stadheim LM, Srinivasan A, Burgart LJ, Gores GJ. (2001) Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. *J Hepatol.* 34, 248-53.
- Nicoll J, Cruikshank WW, Brazer W, Liu Y, Center DM, Kornfeld H. (1999) Identification of domains in IL-16 critical for biological activity. *J Immunol.* 163, 1827-32.
- Obsilova V, Vecer J, Herman P, Pabianova A, Sulc M, Teisinger J, Boura E, Obsil T. (2005) 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. *Biochemistry.* 44, 11608-17.
- O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC. (1998) Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* 17, 384-95.

- Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S. (1993) Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*. 364, 806-9.
- Oo YH, Hubscher SG, Adams DH. (2010) Autoimmune hepatitis: new paradigms in the pathogenesis, diagnosis, and management. *Hepatol Int*. 4, 475-93.
- Pacholec M, Bleasdale JE, Chrnyk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS, Griffith D, Griffor M, Loulakis P, Pabst B, Qiu X, Stockman B, Thanabal V, Varghese A, Ward J, Withka J, Ahn K. (2010) SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem*. 285, 8340-51.
- Palaniappan M, Menon KM. (2010) Human chorionic gonadotropin stimulates theca-interstitial cell proliferation and cell cycle regulatory proteins by a cAMP-dependent activation of AKT/mTORC1 signaling pathway. *Mol Endocrinol*. 24, 1782-93.
- Plas DR, Thompson CB. (2003) Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *J Biol Chem*. 278, 12361-6.
- Prince HE. (2005) Biomarkers for diagnosing and monitoring autoimmune diseases. *Biomarkers*. 10 , S44-9.
- Pritchard J, Tsui S, Horst N, Cruikshank WW, Smith TJ. (2004) Synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis, like fibroblasts from Graves' disease, express high levels of IL-16 when treated with Igs against insulin-like growth factor-1 receptor. *J Immunol*. 173, 3564-9.
- Raghupathy R (1997) Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 18, 478–482.
- Raghupathy R. (2001) Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 Paradigm. *Semin Immunol*. 13, 219-27.
- Rao CV. (2001) An overview of the past, present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine. *Sem Reprod Endocrinol*. 19, 7-17.
- Reinhard G, Noll A, Schlebusch H, Mallmann P, Ruecker AV (1998) Shifts in the Th1/Th2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochem Biophys Res Comm* 245, 933–938.
- Rodriguez I, Matsuura K, Khatib K, Reed JC, Nagata S, Vassalli P. (1996) A bcl-2 transgene expressed in hepatocytes protects mice from fulminant liver destruction but not from rapid death induced by antiFas antibody injection. *J Exp Med* 183, 1031-1036.
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Khwaja A, Marte BM, Pappin D, Das P, Waterfield MD, Ridley A, Downward J. (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell*. 89, 457-67.

- Rumsaeng V, Cruikshank WW, Foster B, Prussin C, Kirshenbaum AS, Davis TA, Kornfeld H, Center DM, Metcalfe DD. (1997) Human mast cells produce the CD4+ T lymphocyte chemoattractant factor, IL-16. *J Immunol.* 159, 2904-10.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675-87.
- Sciaky D, Brazer W, Center DM, Cruikshank WW, Smith TJ. 2000 Cultured human fibroblasts express constitutive IL-16 mRNA: cytokine induction of active IL-16 protein synthesis through a caspase-3-dependent mechanism. *J Immunol.* 164, 3806-14.
- Seino K, Kayagaki N, Takeda K, Fukao K, Okumura K, Yagita H. (1997) Contribution of Fas ligand to T cell-mediated hepatic injury in mice. *Gastroenterology.* 113, 1315-22.
- Skalhegg BS, Tasken K. (2000) Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* 5, 678-93.
- Smith DF, Toft DO. (1993) Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol.* 7, 4-11.
- Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. (2003) RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med.* 9, 347-51.
- Song XY, Zeng L, Jin W, Pilo CM, Frank ME, Wahl SM. (2000) Suppression of streptococcal cell wall-induced arthritis by human chorionic gonadotropin. *Arthritis Rheum.* 43, 2064-72.
- Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Müller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. (1996) Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med.* 2, 1361-6.
- Strand S, Hofmann WJ, Grambihler A, Hug H, Volkmann M, Otto G, Wesch H, Mariani SM, Hack V, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. (1998) Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilson's disease involve CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis. *Nat Med.* 4, 588-93.
- Strand S, Strand D, Seufert R, Mann A, Lotz J, Blessing M, Lahn M, Wunsch A, Broering DC, Hahn U, Grischke EM, Rogiers X, Otto G, Gores GJ, Galle PR. (2004a) Placenta-derived CD95 ligand causes liver damage in hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count syndrome. *Gastroenterology.* 126, 849-58.
- Strand S, Vollmer P, van den Abeelen L, Gottfried D, Alla V, Heid H, Kuball J, Theobald M, Galle PR, Strand D. (2004b) Cleavage of CD95 by matrix metalloproteinase-7 induces apoptosis resistance in tumour cells. *Oncogene.* 23, 3732-6.

- Tagashira M, Yamamoto K, Fujio K, Nagano T, Okamoto R, Ibuki N, Yabushita K, Matsumura S, Okano N, Tsuji T. (2000) Expression of perforin and Fas ligand mRNA in the liver of viral hepatitis. *J Clin Immunol.* 20, 347-53.
- Tagawa Y, Sekikawa K, Iwakura Y. (1997) Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN-gamma(-/-) mice, but not in TNF-alpha(-/-) mice: role for IFN-gamma in activating apoptosis of hepatocytes. *J Immunol.* 159, 1418-28.
- Tagawa Y., Kakuta S., Iwakura Y. (1998) Involvement of Fas/Fas ligand system-mediated apoptosis in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *Eur J Immunol.* 28, 4105-13.
- Tannapfel A, Kohlhaw K, Ebelt J, Hauss J, Liebert U, Berr F, Wittekind C. (1999) Apoptosis and the expression of Fas and Fas ligand (FasL) antigen in rejection and reinfection in liver allograft specimens. *Transplantation.* 67, 1079-83.
- Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. (2007) Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem.* 282, 6823-32.
- Teufel A, Wörns M, Weinmann A, Centner C, Piendl A, Lohse AW, Galle PR, Kanzler S. (2006) Genetic association of autoimmune hepatitis and human leucocyte antigen in German patients. *World J Gastroenterol.* 12, 5513-6.
- Tiegs G., Hentschel J., Wendel A. (1992) A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest.* 90, 196-203.
- Tissenbaum HA, Guarente L. (2001) Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410, 227-30.
- Tran H, Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace AJ Jr, DiStefano PS, Chiang LW, Greenberg ME. (2002). DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science.* 296, 530-4.
- Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Möller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science.* 245, 301-5.
- Trowsdale J, Betz AG. (2006) Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nat Immunol.* 7, 241-6.
- Tsai KL, Sun YJ, Huang CY, Yang JY, Hung MC, Hsiao CD. (2007) Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA complex suggests the effects of post-translational modification. *Nucleic Acids Res.* 35, 6984-94.
- Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP. (2004) The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J.* 380, 297-309.

- Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA. (2001) hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*. 107, 149-59.
- Watanabe Y, Morita M, Akaike T. (1996) Concanavalin A induces perforin-mediated but not Fas-mediated hepatic injury. *Hepatology*. 24, 702-10.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 14, 353-356.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 292, 727-30.
- Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R. (2007) Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*. 8, 950-7.
- Won CK, Ji HH, Koh PO. (2006) Estradiol prevents the focal cerebral ischemic injury-induced decrease of forkhead transcription factors phosphorylation. *Neurosci Lett*. 398, 39-43.
- Wu DM, Zhang Y, Parada NA, Kornfeld H, Nicoll J, Center DM, Cruikshank WW. (1999) Processing and release of IL-16 from CD4+ but not CD8+ T cells is activation dependent. *J Immunol*. 162, 1287-93.
- Xu L, Zhao Y, Qin Y, Xu Q. (2006) A novel model of acute liver injury in mice induced by T cell-mediated immune response to lactosylated bovine serum albumin. *Clin Exp Immunol*. 144, 125-33.
- Yang J, Liu CQ. (2000) Interaction between human interleukin-16 and CD4 receptor of HIV-1. *Acta Pharmacol Sin*. 21, 547-53.
- Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C. (2008) T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*. 28, 29-39.
- You H, Pellegrini M, Tsuchihara K, Yamamoto K, Hacker G, Erlacher M, Villunger A, Mak TW. (2006) FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med*. 203, 1657-63.
- Zhao Y, Li S, Childs EE, Kuharsky DK, Yin XM. (2001) Activation of pro-death Bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway in tumor necrosis factor-alpha-induced liver injury. *J Biol Chem*. 276, 27432-40.

Zhao Y, Ding WX, Qian T, Watkins S, Lemasters JJ, Yin XM. (2003) Bid activates multiple mitochondrial apoptotic mechanisms in primary hepatocytes after death receptor engagement. *Gastroenterology*. 125, 854-67.

Zygmunt M, Herr F, Münstedt K, Lang U, Liang OD. (2003) Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003, 110 , S10-8.

6 ANHANG

6.1 Abkürzungsverzeichnis

A	AIH	Autoimmunhepatitis
	ALT	Alanin-Aminotransferase
	Anti-APO-1	agonistischer anti-CD95 Antikörper
	AST	Aspartat-Aminotransferase
B	ATP	Adenosintriphosphat
	BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
	BAX	<i>Bcl-2 analogous protein</i>
	Bcl-2	<i>b-cell lymphoma/leukaemia-2 gene</i>
	Bcl-x	<i>b-cell lymphoma leucemia-x</i>
C	Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
	°C	Grad Celsius
	CD	cluster of differentiation
	CD4	T-Zell Oberflächenmarker
D	ConA	Concanavalin A
	Cyt C	Cytochrom C
	DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
E	DISC	<i>death inducing signalling complex</i>
	DNA	Desoxyribonukleinsäure
F	ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	FoxO	Forkhead box class O
	g	Gramm
H	GDP	Guanosindiphosphat
	GTP	Guanosintriphosphat
	hCG	humanes Choriogonadotropin
I	HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
	HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
	IL	Interleukin
K	kg	Kilogramm
	L	L
LCF		<i>lymphocyte chemoattractant factor</i>
M	mA	Milliampere
	Mcl-1	myeloid cell leukaemia sequence 1
	mg	Milligramm
	mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	NK-Zellen	natürliche Killerzellen
P	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
R	RLU	<i>relative light units</i>
	RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
S	SDS	Sodiumdoceylsulfat
	Sir2	<i>silent mating type information regulator 2</i>
T	tBid	<i>truncated Bid</i>
	TGFβ-IIR	<i>Tumor growth factor beta II receptor</i>
	Th	<i>T helper</i>
	TNF	Tumornekrosefaktor

U	TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
	µg	Mikrogramm
	µl	Mikroliter
Z	z.B.	zum Beispiel

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Verlauf einer AIH während zwei Schwangerschaften	11
Abb. 2 Aktivierung des LH/CG Rezeptors	17
Abb. 3 Extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg	23
Abb. 4 Phosphorylierung von Foxo3a	27
Abb. 5 Regulation der FoxO Proteine	28
Abb. 6 Sirt1 als Langlebigkeitsgen	31
Abb. 7 Modell für chronischen Leberschaden in Mäusen induziert durch lactsoyliertes BSA	35
Abb. 8 Übersicht der verwendeten Foxo3a Plasmide	39
Abb. 9 Prinzip der verwendeten Plasmide	40
Abb. 10 hCG schützt Mäuse vor akutem Leberversagen induziert durch ConA.	62
Abb. 11 hCG schützt Mäuse vor akutem Leberversagen induziert durch den agonistischen CD95-Antikörper Jo-2	63
Abb. 12 hCG schützt Mäuse vor chronischer Leberentzündung induziert durch die Gabe von lacBSA	64
Abb. 13 hCG reduziert die Anzahl an apoptotischen Zellen und verhindert die Infiltration von CD4 ⁺ Zellen in die Leber	65
Abb. 14 Expression des LH/CG-Rezeptors in primären humanen Hepatozyten	66
Abb. 15 Anti-apoptotische Wirkung von hCG in primären Hepatozyten	67
Abb. 16 Kokulturassay mit zytotoxischen T-Zellen und humanen primären Hepatozyten	68
Abb. 17 Herunterregulation von IL-16 in hCG-behandelten Mäusen	70
Abb. 18 IL-16 wird in humanen Hepatozyten exprimiert	71
Abb. 19 Reduktion der Caspase-3 Aktivität und IL-16-Konzentration durch hCG	72
Abb. 20 Reduktion der Chemotaxis von CD4 ⁺ Zellen durch hCG	73
Abb. 21 IL-16 Konzentration in Seren von Patienten mit immunopathologischen Lebererkrankungen	74
Abb. 22 Anstieg der cAMP Konzentration in Leber und Milz	75
Abb. 23 Akt Phosphorylierung in verschiedenen primären Zellen	76
Abb. 24 hCG führt zur Herrunterregulation von Bim und Puma	77
Abb. 25 hCG-vermittelte Translokation von Foxo3a aus dem Zellkern	79
Abb. 26 hCG-vermittelte Inaktivierung der transkriptionellen Aktivität von Foxo3a	80
Abb. 27 hCG-induzierte Akt Phosphorylierung im zeitlichen Verlauf	80
Abb. 28 Hemmung des hCG-Signalweges in Hepatozyten	81
Abb. 29 Erhöhte Ras-Aktivität nach hCG Behandlung	83
Abb. 30 Hemmung der anti-apoptotischen hCG-Wirkung durch Sirtinol	85
Abb. 31 Aktivierung von Sirt1 durch Phosphorylierung und Translokation in den Kern	86
Abb. 32 hCG-abhängige Phosphorylierung von Sirt1	87
Abb. 33 Verstärkte Hemmung der Aktivität von Foxo3a durch Sirt1 und hCG	88
Abb. 34 Deacetylierung von Foxo3a nach hCG Behandlung	89
Abb. 35 Signalweg und Wirkmechanismus von hCG in Hepatozyten	99

6.3 Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

In Revision:

Caroline Steinmetz^{*}, Anubha Kashyap^{*}, Shenchu Jin, Andreas Teufel, Susanne Rühl, Henning Schulze-Bergkamen, Johannes Lotz, Jürgen Kuball, Matthias Theobald, Gerd Otto, Peter Galle, Dennis Strand, Susanne Strand: Human chorionic gonadotropin exerts a therapeutic effect on chronic inflammation and hepatic injury by regulating the longevity proteins Foxo3a and SIRT1

^{*} gemeinsame Erstautorenschaft

Posterbeiträge:

Steinmetz C, Kashyap A, Otto G, Galle PR, Strand D, Strand S (2009): Human chorionic gonadotropin attenuates cytotoxic T cell responses by inducing apoptosis resistance and preventing IL-16 release. 7. Meeting der "Association for cancer immunotherapy (CIMT)", Mainz.

Steinmetz C, Jin S, Rühl S, Schulze-Bergkamen H, Lotz J, Kuball J, Theobald M, Otto G, Galle PR, Strand D, Strand S (2009): Modulation of the longevity proteins FOXO3a and SIRT1 by chorionic gonadotropin prevents hepatocellular injury during acute liver inflammation. 26. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), Heidelberg.

Steinmetz C, Jin S, Germani O, Otto G, Galle PR, Strand D, Strand S (2008): Human chorionic gonadotropin (HCG) inhibits T-cell mediated liver damage and hepatocyte apoptosis by regulation of the forkhead transcription factor Foxo3a. 25. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), Frankfurt.

Maas C, Jin S, Germani O, Otto G, Galle PR, Strand D, Strand S (2007): Human chorionic gonadotropin protects against T cell-mediated liver injury in mice by downregulating Bim and Puma. 37. Jahrestagung der Gesellschaft für Immunologie (DGfI), Heidelberg.