

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

I.Medizinische Klinik

Klinikdirektor Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

**„Untersuchung der Rolle von Activin  $\beta$ A und Follistatin bei autoimmunen  
Lebererkrankungen“**

Dissertation  
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:  
von Carsten Stürmer  
aus Saarbrücken

Hamburg 2012

Meinen Eltern

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 9. August 2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. Christoph Schramm

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:

Prof. Dr. Martina Koch

Prüfer:

Prof. Dr. Carsten Bokemeyer

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.2 Die TGF- $\beta$ Familie .....	<b>8</b>
1.2 Struktur der Inhibin/Activin-Familie .....	<b>9</b>
1.2.1 $\beta$ -A Untereinheit .....	10
1.2.2 $\beta$ -B Untereinheit .....	10
1.2.3 Weitere $\beta$ -Untereinheiten.....	10
1.3 Follistatin und andere Activin bindende Proteine.....	<b>11</b>
1.4 Die Rezeptoren.....	<b>12</b>
1.4.1 Typ I und Typ II Rezeptoren.....	12
1.4.2 Typ III Rezeptoren.....	13
1.5 Die Signalkaskade .....	<b>14</b>
1.5.1 Smad Proteine .....	14
1.5.2 Weitere regulatorische Proteine.....	17
1.6 Die Funktionen von Activin und Follistatin.....	<b>18</b>
1.6.1 Activin und Follistatin in der Entzündung und Wundheilung .....	19
1.6.2 Activin und Leber.....	20
1.7 TGF- $\beta$ .....	<b>22</b>
1.8 Transgene Mausmodelle .....	<b>23</b>
1.8.1 Die Genregulation.....	24
1.9 Autoimmune Lebererkrankungen.....	<b>26</b>
1.9.1 Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC).....	26
1.9.2 Autoimmune Hepatitis (AIH).....	28
<b>2. Ziele der Arbeit</b> .....	<b>30</b>
<b>3. Materialien</b> .....	<b>31</b>
3.1 Geräte .....	<b>31</b>
3.2 Software.....	<b>32</b>
3.3 Chemikalien .....	<b>32</b>
3.4 Puffer und Lösungen .....	<b>32</b>
3.5 Wasser.....	<b>34</b>
3.6 Antikörper und ELISA-Kits .....	<b>34</b>
3.7 Oligonukleotide.....	<b>35</b>
3.8 Klonierungsvektoren .....	<b>36</b>
3.9 Bakterienstämme.....	<b>36</b>
3.10 Material für die Klonierung.....	<b>36</b>
3.11 Zellen.....	<b>37</b>
3.12 Zellkulturmedien und -zusätze.....	<b>37</b>
3.13 Sonstige Materialien .....	<b>37</b>
<b>4. Methoden</b> .....	<b>39</b>
4.1 Immunologisch.....	<b>39</b>
4.1.2 ELISA .....	39
4.1.3 Histologie.....	42
4.2 Klonierungen .....	<b>45</b>
4.2.1 Plasmide.....	45
4.2.2 Promoter.....	45
4.2.2 Herstellung von kompetenten Zellen.....	46
4.2.3 Transformation von Bakterien und Plasmidpräparation.....	46
4.2.4 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse.....	47
4.2.7 Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA:.....	48
4.2.8 Restriktion mittels Restriktionsenzymen .....	49
4.2.9 Dephosphorylierung.....	49
4.2.10 Auffüllen überhängender Enden mit Klenow-Enzym .....	50

4.2.11 Ligation .....	50
4.2.12 DNA-Gelelektrophorese .....	50
4.2.13 Gelaufreinigung .....	51
<b>4.3 Zellkultur .....</b>	<b>52</b>
4.3.1 Transfektion:.....	52
4.3.2 Kultur der Lymphozytenzelllinie (EL4) und der Hepatozytenzelllinie (Hepa 1,6).....	52
4.3.3 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	53
4.3.4 Herstellen stabiler Zelllinien.....	53
4.3.5 Kryokonservierung von Zellen.....	54
4.3.6 Kryokonservierung von Bakterien .....	54
4.3.7 RNA-Isolierung.....	54
4.3.8 Herstellung von cDNA aus RNA .....	55
4.3.9 Polymerase-Ketten-Reaktion.....	55
4.3.10 Gelaufreinigung mit dem GeneClean II Kit.....	56
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
5.1.1 Die Expressionvektorkassette.....	58
5.1.2 Präparation des Activin- und Follistatins .....	60
5.2 Klonierung der Albuminvektoren .....	62
5.3 Sequenzierung der Albuminexpressionskassetten .....	63
5.4 Funktionelle Überprüfung der Albumin-Konstrukte .....	63
5.6 Die hCD2 Expressionsvektoren .....	64
5.6.1 Funktionelle Überprüfung der Vektoren in EL-4 T-Zellen.....	64
5.6.2 Aufreinigung der DNA.....	65
5.6.3 Präparation der Expressionsvektoren.....	65
5.7 Analyse der Serumspiegel von Activin und Follistatin .....	67
5.7.1 Serumproben der gesunden Probanden.....	67
5.7.2 Serumproben der Patienten mit einer chronischen Hepatitis C .....	67
5.8 Korrelation von Activin-, Follistatin- und gesamt TGF- $\beta$ Serumspiegeln bei Patienten mit einer PSC in Abhängigkeit des Fibrosegrades .....	69
5.9 Vergleich von Activin-, Follistatin- und gesamt TGF- $\beta$ Serumspiegeln bei Patienten mit einer AIH in Abhängigkeit des Fibrosegrades .....	71
5.10 Vergleich der Serumspiegel von Activin, Follistatin und Follistatin bei Hepatitis C, PSC und AIH .....	72
5.10.1 Activin- Serumspiegel bei Patienten mit einer PSC, chronischen Hepatitis C und AIH im Vergleich.....	72
5.10.2 Follistatin-Serumspiegel bei Patienten mit PSC, AIH und chronischer Hepatitis C im Vergleich .....	75
5.10.3 Der Quotient Activin/Follistatin bei Patienten mit PSC, AIH und chronischer Hepatitis C im Vergleich .....	78
5.10.4 TGF- $\beta$ Serumspiegel bei Patienten mit PSC, AIH und chronischer Hepatitis C im Vergleich .....	81
5.11 Einfluss der Entzündungsaktivität auf Activin und Follistatin bei Patienten mit einer AIH .....	83
5.11.1 Activin-Serumspiegel in Abhängigkeit der entzündlichen Aktivität bei Patienten mit AIH .....	84
5.11.2 Follistatin in Abhängigkeit der entzündlichen Aktivität .....	85
5.11.3 TGF- $\beta$ in Abhängigkeit der entzündlichen Aktivität bei Patienten mit einer AIH .....	85
5.12 Histologische Analyse der Expression von Activin .....	86
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>91</b>
6.1 Die Bedeutung von Activin, Follistatin und TGF- $\beta$ für die Fibrogenese und Entzündung ....	91
6.1.1 Activin A, Follistatin und TGF- $\beta$ 1 und Fibrose.....	92
6.1.2 Activin, Follistatin und TGF- $\beta$ und Entzündung bei AIH .....	99
6.2 Die Genexpressionskassetten.....	104
6.2.1. Vektoren unter dem Albuminpromotor .....	105

6.2.2. Vektoren unter dem T-Zell Promotor:.....	107
<b>7. Zusammenfassung .....</b>	<b>109</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>9. Anhang: Genkarten.....</b>	<b>112</b>
<b>10. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>115</b>
<b>11. Danksagung .....</b>	<b>133</b>
<b>12. Lebenslauf.....</b>	<b>134</b>
<b>13. Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>136</b>

# 1. Einleitung

Activine und Inhibine sind Moleküle, die vor mehr als 65 Jahren erstmals beschrieben wurden. McCullagh beschrieb Mitte der dreißiger Jahre erstmals die Rolle dieser Proteine in der Zyklusregulation (McCullagh 1932; Ling, Ying et al. 1986; Halvorson and DeCherney 1996). Erst Mitte der achtziger Jahre konnten die jeweiligen Moleküle eindeutig identifiziert werden. Die Funktion von Activin und Inhibin, welche in einigen Geweben antagonistisch wirken (Vale, Rivier et al. 1988), und des funktionellen physiologischen Antagonist Follistatin wurden Mitte der neunziger Jahre beschrieben (Shimonaka, Inouye et al. 1991; Schneyer, Rzucidlo et al. 1994). Man erkannte, dass diese Wachstumsfaktoren ubiquitär vorkommen und an verschiedene Rezeptoren binden, die wiederum nicht nur Activin, sondern auch andere Wachstumsfaktoren binden. Das Activin/Inhibin System war weitaus komplexer als zunächst angenommen.

Activine werden aufgrund ihrer Struktur einer Gruppe von Wachstums- beziehungsweise wachstumshemmenden Faktoren zugeordnet, die als Transforming-Growth-Factor  $\beta$  Familie bezeichnet wird (Chang, Brown et al. 2002). Es handelt sich um Peptide, die nach der üblichen Nomenklatur aus  $\beta$ -Untereinheiten zusammengesetzt sind. Bisher wurden vier verschiedene  $\beta$ -Untereinheiten in Säugetieren charakterisiert ( $\beta$ A,  $\beta$ B,  $\beta$ C (Schmitt, Hotten et al. 1996) und  $\beta$ E (Fang, Yin et al. 1996). Drei Vertreter der Activin-Familie, die jeweils aus unterschiedlich kombinierten  $\beta$ A und  $\beta$ B Untereinheiten bestehen, sind bereits gut charakterisiert. Über die Untereinheiten  $\beta$ C und  $\beta$ E ist noch wenig bekannt, wahrscheinlich ist jedoch, dass sie eine Rolle in der Regulierung des Leberwachstums spielen (Butler, Gold et al. 2005; Gold, Zhang et al. 2005).

Activine und Follistatine sind Mitglieder der TGF- $\beta$  Familie und ubiquitär im Organismus vorhanden (Govinden and Bhoola 2003). Ihre Rolle bei Krebsentstehung (Bachman and Park 2005; Chen, Wang et al. 2006), Entzündung (Werner and Alzheimer 2006), und Schwangerschaft wurde erst in den letzten Jahren intensiver erforscht. In der vorliegenden Arbeit soll die Rolle von Activin  $\beta$ A und von Follistatin auf die Genese von Entzündung und Fibrose in der Entstehung von autoimmunen Lebererkrankungen untersucht werden.

## 1.2 Die TGF- $\beta$ Familie

Die TGF- $\beta$  Superfamilie ist eine große Gruppe extrazellulärer Wachstumsfaktoren, die viele Aspekte der Zell- und Organentwicklung kontrollieren. Homo- und Heterodimere der TGF  $\beta$ -Familie binden und aktivieren zwei Typen transmembranständiger Serin/Threoninkinase-Rezeptoren, die dann regulatorische Smad Proteine phosphorylieren und dadurch Zielgene modulieren. Die Regulierung der Signaltransduktion erfolgt sowohl intra-, als auch extrazellulär (Abe, Minegishi et al. 2004).

Die TGF- $\beta$  Familie besteht aus mehr als 35 Proteinen, darunter TGF- $\beta$ , Activin, Inhibin, bone morphogenetic protein (BMP) und growth/differentiation factors (GDF). Die Liganden der TGF- $\beta$  Familie werden als Präpropeptide mit einem Signalpeptid am N-Terminus sezerniert. Charakteristisch sind sechs bis neun Cysteinreste, die in dem fertigen Protein die inter- und intramolekularen Disulfidbrücken bilden (Padgett, Savage et al. 1997). Einige Mitglieder der Familie haben eine Substitution eines Cysteins durch ein Serin (z.B. GDF-9, BMP-15). Deswegen sind diese, im Gegensatz zum Rest der Familie, nicht kovalent miteinander verbunden und somit labiler (Chang, Brown et al. 2002).

Die TGF- $\beta$ 's werden als latente Form freigesetzt, die aktive Domäne des Proteins wird durch das Propeptid (LAP) maskiert. Diese wird vom reifen Protein durch eine furin-like Protease abgespalten, bleibt allerdings über nicht-kovalente Bindungen mit dem aktiven Protein verbunden (Dubois, Laprise et al. 1995). Die Dissoziation vom LAP aktiviert die Unterfamilie der Liganden und wahrscheinlich auch andere Mitglieder der TGF $\beta$ -Familie (Young and Murphy-Ullrich 2004).

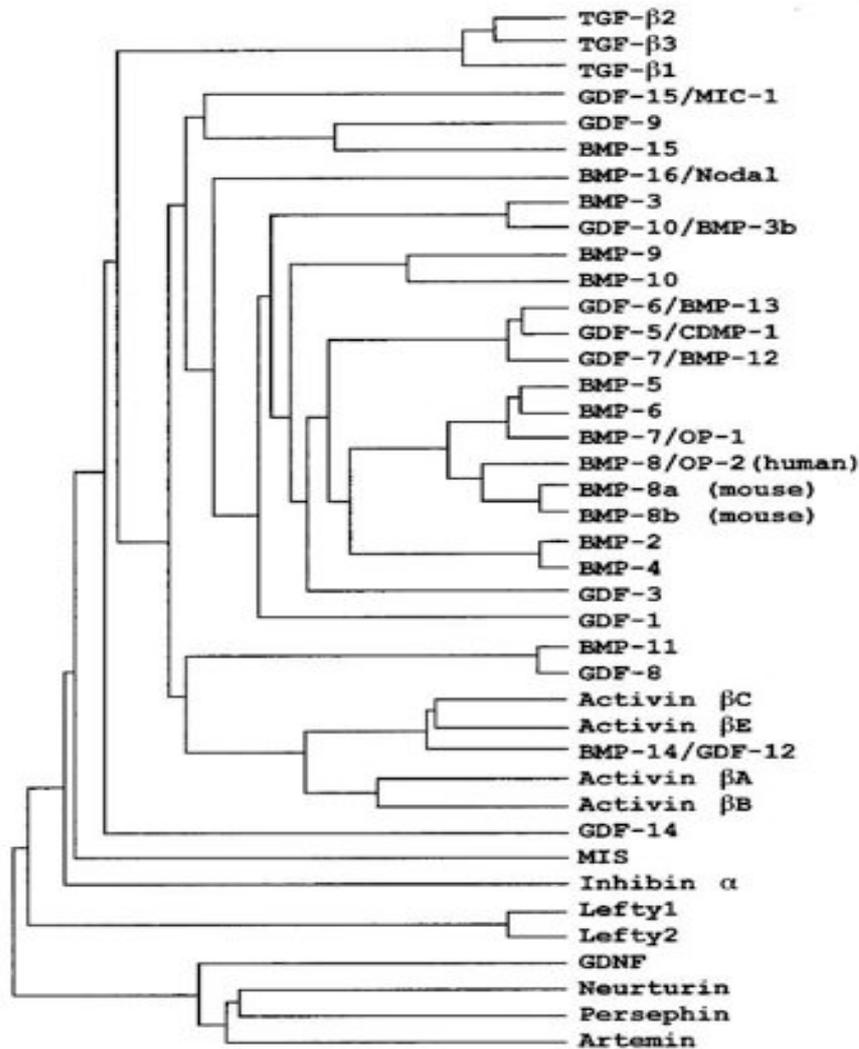


Abb. 1: Homologie der Aminosäuren in der Familie der TGF $\beta$  Proteine (Modifiziert nach (Chang, Brown et al. 2002).

## 1.2 Struktur der Inhibin/Activin-Familie

Inhibin wurde 1985 aus Follikelflüssigkeit des Schweins als Protein isoliert und charakterisiert, nachdem man schon in den dreißiger Jahren herausfand, dass Follikelflüssigkeit die Sekretion des Follikel-Stimulierenden Hormones (FSH) in Zellen des Hypophysenvorderlappens supprimiert (Ling, Ying et al. 1986).

Es zeigte sich, dass Inhibin als Heterodimer aus zwei Untereinheiten, einer  $\alpha$ -Untereinheit und einer  $\beta$ A- oder  $\beta$ B-Untereinheit, zusammengesetzt ist. Außerdem fand man Proteine, die nur aus  $\beta$ A- und  $\beta$ B-Untereinheiten bestehen und über Disulfidbrücken miteinander verbunden

sind. Diese Proteine nannte man in Analogie Activine. Die neuen Proteine waren in ihrem Aufbau anderen Proteinen der TGF- $\beta$  Familie ähnlich (Ying 1987).

### 1.2.1 $\beta$ -A Untereinheit

Die mRNA der Activin  $\beta$ A Untereinheit kodiert ein 426 AS langes Präpropeptid, das aus einem 28 AS langen Signalpeptid besteht und dem eine Proregion folgt. Das eigentliche C-terminal gelegene Peptid ist 116 AS lang und wird proteolytisch von der prä-pro-Region abgespalten, um das dimere bioaktive Protein zu formen. Die Gene der Activin-Untereinheit  $\beta$ A, der Maus, Ratte, des Menschen, des Schweins und des Rindes sind hochkonserviert, und die Proteine nahezu identisch (Schwall, Nikolics et al. 1988).

Die menschliche  $\beta$ A-Untereinheit ist auf dem Chromosom 7 locus 7p15-p14 kodiert. Das Gen besteht aus 3 Exons.

### 1.2.2 $\beta$ -B Untereinheit

Die mRNA der  $\beta$ -B Untereinheit ist aus einem 407 AS Vorläuferprotein zusammengesetzt. Es besteht aus einer Signalsequenz und einer 292 AS Proregion, der das reife Protein mit 115 AS folgt. Beide Activin-Untereinheiten haben im Gegensatz zu den Inhibin-Untereinheiten keine Glykosylierungsregionen. Die Untereinheiten weisen untereinander 70% Homologien auf (Vale, Rivier et al. 1988).

### 1.2.3 Weitere $\beta$ -Untereinheiten

Die Eigenschaften von den erst kürzlich entdeckten  $\beta$ C,  $\beta$ D und  $\beta$ E Untereinheiten sind noch weitgehend unbekannt. Die  $\beta$ C und die  $\beta$ E Untereinheiten werden vor allem in der Leber exprimiert. In der Zellkultur wurde nachgewiesen, dass entartete Leberzellen diese Untereinheiten nicht mehr bilden, somit vermutet man, dass auch diese eine wachstumskontrollierende Funktion haben (Vejda, Cranfield et al. 2002). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Activin  $\beta$ C und  $\beta$ E Apoptose, ähnlich Activin  $\beta$ A, induzieren können (Vejda, Erlach et al. 2003). Activin  $\beta$ C und  $\beta$ E Knockoutmäuse zeigten keinen Phänotyp, so dass man vermutet, dass andere Mitglieder der TGF $\beta$  Familie die Funktion dieser

Proteine übernehmen können (Lau, Kumar et al. 2000). Für Activin  $\beta E$  ist nachgewiesen worden, dass dessen Wirkung auch von Follistatin neutralisiert werden kann (Hashimoto, Tsuchida et al. 2002). Activin  $\beta D$  ist bis jetzt nur im *Xenopus laevis* nachgewiesen worden. Eine Relevanz für Säugetiere wurde bislang für Activin  $\beta D$  nicht nachgewiesen (Oda, Nishimatsu et al. 1995).

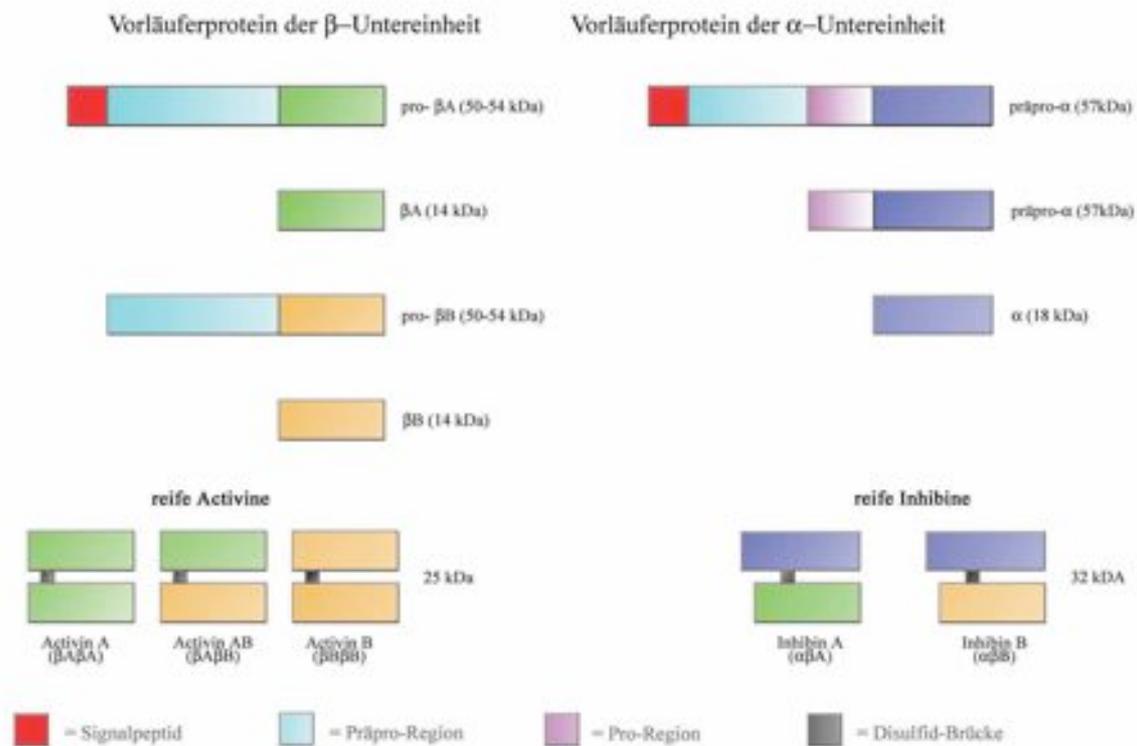


Abb. 2: Struktur der Inhibin und Activin und deren Vorläuferproteine (modifiziert nach Hilden, 2002)

### 1.3 Follistatin und andere Activin bindende Proteine

Activine interagieren mit einer Reihe von Proteinen. Hierunter ist Follistatin das Protein, welches am genauesten erforscht ist. Es existiert in drei unterschiedlichen Isoformen, die vom gleichen Gen transkribiert werden. Diese Isoformen entstehen entweder durch alternatives Splicing oder durch Proteolyse des fertigen Proteins. Die drei unterschiedlichen Isoformen ergeben ein Protein mit 288 Aminosäuren und ein Protein mit 315 Aminosäuren, sowie ein intermediäres Protein mit 303 Aminosäuren (Shimasaki, Koga et al. 1988). Diese Isoformen binden Activin nicht mit der gleichen Affinität. So konnte für die Follistatin 288 Isoform

nachgewiesen werden, dass sie Activin stärker neutralisiert als Follistatin 315 (Hashimoto, Kawasaki et al. 2000). Follistatin 315 ist gut wasserlöslich und somit im Serum die vorherrschende Isoform (Schneyer, Wang et al. 2004). Follistatin bindet Activin direkt an der  $\beta$ A-Untereinheit (Shimonaka, Inouye et al. 1991) und neutralisiert die Wirkung von Activin, indem es die Bindung von Activin an den Activin Rezeptor II verhindert (de Winter, ten Dijke et al. 1996). Follistatin kann außerdem an BMP-7 binden (Dale, Sattar et al. 1999). Follistatin bindet an Activin irreversibel und mit einer hohen Affinität (Schneyer, Rzucidlo et al. 1994). Die Komplexe aus Follistatin und Activin werden an Proteoglykane der Zellmembran gebunden, internalisiert und schließlich in Lysosomen abgebaut. Obwohl Follistatin auch Inhibin an seiner  $\beta$ -Untereinheit binden kann, neutralisiert es dessen Wirkung nicht (Mather, Roberts et al. 1993).

Ein erst kürzlich entdecktes Protein ist das Follistatin-related-Protein (FSRP) oder auch Follistatin-like 3 (Hayette, Gadoux et al. 1998), dessen Affinität für Activin allerdings nicht so hoch ist, wie die von Follistatin (Sidis, Tortoriello et al. 2002). FSrP neutralisiert endogenes und exogen zugeführtes Activin in unterschiedlichen Ausmaß (Schneyer, Schoen et al. 2003).

Ein weiteres Activin bindendes Protein ist das  $\alpha$ 2-Makroglobulin, das Activin mit geringer Affinität bindet und dessen Wirkung nicht beeinflusst (Vaughan and Vale 1993). Wahrscheinlich spielt es eine Rolle als Trägerprotein bei der Zirkulation des Activins im Körper.

## 1.4 Die Rezeptoren

Die Liganden der TGF $\beta$ -Superfamilie binden als Rezeptoren an eine Reihe von transmembranständigen Serin/Threonin Kinasen. Aufgrund von strukturellen und funktionellen Eigenschaften werden die TGF $\beta$ -Rezeptoren in 2 Gruppen eingeteilt:

### 1.4.1 Typ I und Typ II Rezeptoren

Die Typ I und II Rezeptoren sind Glykoproteine von ca. 65 kDA bzw. 70 kDa (Attisano, Carcamo et al. 1993). Die extrazelluläre Region dieser Rezeptoren besteht aus etwa 150 Aminosäuren mit 10 oder mehr Cysteinen, die die Faltung der extrazellulären Region bestimmen. Alle Typ I Rezeptoren haben die 30 Aminosäuren lange intrazelluläre Region

gemein, die unmittelbar der Kinasedomäne voraus geht. Diese Region wird auch die GS Domäne genannt, weil sie eine SGSGSG Sequenz enthält (Mathews and Vale 1993). TGF $\beta$  und Activine binden direkt an Typ II Rezeptoren, die dann wiederum Typ I Rezeptoren rekrutieren. Erst das Zusammenkommen beider Rezeptoren führt zu einer Phosphorylierung des Typ I Rezeptors durch die GS-Sequenz des Typ II Rezeptors. Dieser nun aktivierte Typ I Rezeptor wiederum phosphoryliert Smad Proteine, die ein Signal zum Nukleus weiterleiten (Hilden, Tuuri et al. 1994).

#### 1.4.2 Typ III Rezeptoren

Für die TGF- $\beta$  Familie sind weiterhin Typ III Rezeptoren beschrieben (Rotzer, Roth et al. 2001). Betaglykan und Endoglin sind Beispiele für solche Typ III Rezeptoren, die ein höheres Molekulargewicht als die Typ I und II Rezeptoren besitzen. Endoglin wird hauptsächlich auf Endothelzellen und Monozyten exprimiert (Gougos and Letarte 1990; Barbara, Wrana et al. 1999). Betaglykan ist ein in der Membran verankertes Proteoglykan, das TGF- $\beta$ 's binden kann und so dessen Interaktion mit dem Typ II Rezeptor vereinfacht (Cheifetz and Massague 1991). Betaglykan kann auch Inhibin binden und dessen Bindung an den Activin Typ II Rezeptor erleichtern. Inhibin konkurriert mit Activin um die Bindungsstelle und antagonisiert damit die Signaltransduktion von Activin (Lewis, Gray et al. 2000). Außerdem existiert ein spezifischer Inhibin Rezeptor, der als p120 oder InhBP bezeichnet wird. Dieser interagiert mit dem Activin Rezeptor I und Inhibin B (aber nicht mit Inhibin A) und stört deren Bindung, was somit zu einer Störung der Activin Signalkaskade in vitro führte (Miyazono 1997).

Inhibin A scheint Betaglykan und den Activin Rezeptor IIA zu einem Komplex zu binden, und somit die Bildung des Activin RIIA-Activin RIB zu verhindern (Chapman, Bernard et al. 2002).

## 1.5 Die Signalkaskade

### 1.5.1 Smad Proteine

Smads sind Proteine mit einem molekularen Gewicht zwischen 42kDa und 60 kDa. Sie haben zwei hochkonservierte Regionen am N- und C-Terminus, die als MH1 und MH2 bezeichnet werden. Die Region dazwischen ist hochvariabel (Shi, Hata et al. 1997).

Smad Proteine sind intrazelluläre Komponenten der Signaltransduktion der TGF- $\beta$  Großfamilie. Sie sind Transkriptionsfaktoren und werden von Zellen von Säugetieren exprimiert. Aus der Familie der Smad Proteine sind über 10 Proteine bekannt. Smad Proteine sind Substrate der Rezeptoren der TGF- $\beta$  Familie und bilden intrazellulär Komplexe, die die Transkription bestimmter Proteine regulieren. Der Smad-Komplex transloziert in den Nukleus, wo über spezielle Partnerproteine das zu regulierende Gen gebunden werden kann (Attisano and Tuen Lee-Hoeflich 2001). Weitergehende Untersuchungen sind nötig, um die Effekte von TGF- $\beta$  Proteinen zu verstehen.

In menschlichen Tumoren wurden Mutationen von Smad Proteinen gefunden, was darauf schließen lässt, dass ihnen ebenfalls eine Rolle in der Wachstumssteuerung zukommt (Deckers, van Dinther et al. 2006).

#### 1.5.1.1 Rezeptor-regulierende Smad's

Smad 1, Smad 2, Smad 3, Smad 5, und Smad 8 können direkt von Typ I Rezeptoren phosphoryliert werden, wenn diese einen Komplex mit dem Liganden und dem Typ II Rezeptor geformt haben. Die Phosphorylierung dieser Smad's führt zur Translokation des Komplexes in den Nukleus, wo sie mit den anderen Smad Proteinen interagieren können und die Gentranskription regulieren (Nakao, Imamura et al. 1997). Smad Proteine sind an unterschiedliche Rezeptoren gekoppelt. Smad 2 und 3 werden nach Bindung mit Activin und TGF- $\beta$  phosphoryliert, während Smad 1 und Smad 5 nach Stimulation durch BMP's phosphoryliert werden (Massague, Seoane et al. 2005).

### 1.5.1.2 Co-Smad's

Co-Smad's (Smad 4, Smad 10) haben einen charakteristischen Zusatz in der MH2 Domäne und es fehlt ihnen am C-Terminus das SSXS Motiv, welches für die Phosphorylierung nötig ist (Hata, Lo et al. 1997; Wu, Zhang et al. 1997). Common Smad's formen Hetero- und Oligodimere mit rezeptorspezifischen Smad Proteinen und translozieren mit diesen in den Nucleus. Smad 4 formt einen Komplex mit Smad 2 und Smad 3 nach der Aktivierung durch TGF- $\beta$  (Liu, Poupponnot et al. 1997).

### 1.5.1.3 Inhibitorische Smad's

Smad 6 und Smad 7 haben eine charakteristische C-terminale MH2 Domäne und der N-Terminus hat wenig mit den MH1 Domänen der anderen Smad's gemeinsam (Massague and Chen 2000). Die einzige bekannte Funktion ist die Störung der Aktivierung der rezeptor-regulierten Smad's. Smad 6 inhibiert vor allem die BMP Signaltransduktion, während Smad 7 die Signaltransduktion von TGF- $\beta$ , Activin und BMP inhibiert. Smad 6 und Smad 4 haben die gleiche Bindungsstelle, wobei ein inaktiver Smad 4-Smad 6 Komplex gebildet wird. Smad 7 besetzt die Phosphorylierungsstelle an Typ I Rezeptoren (Ishisaki, Yamato et al. 1999).

Inhibitorische Smad's haben auch die Funktion einer negativen Rückkopplung und kontrollieren somit verschiedene Wege der Aktivierung durch Liganden.

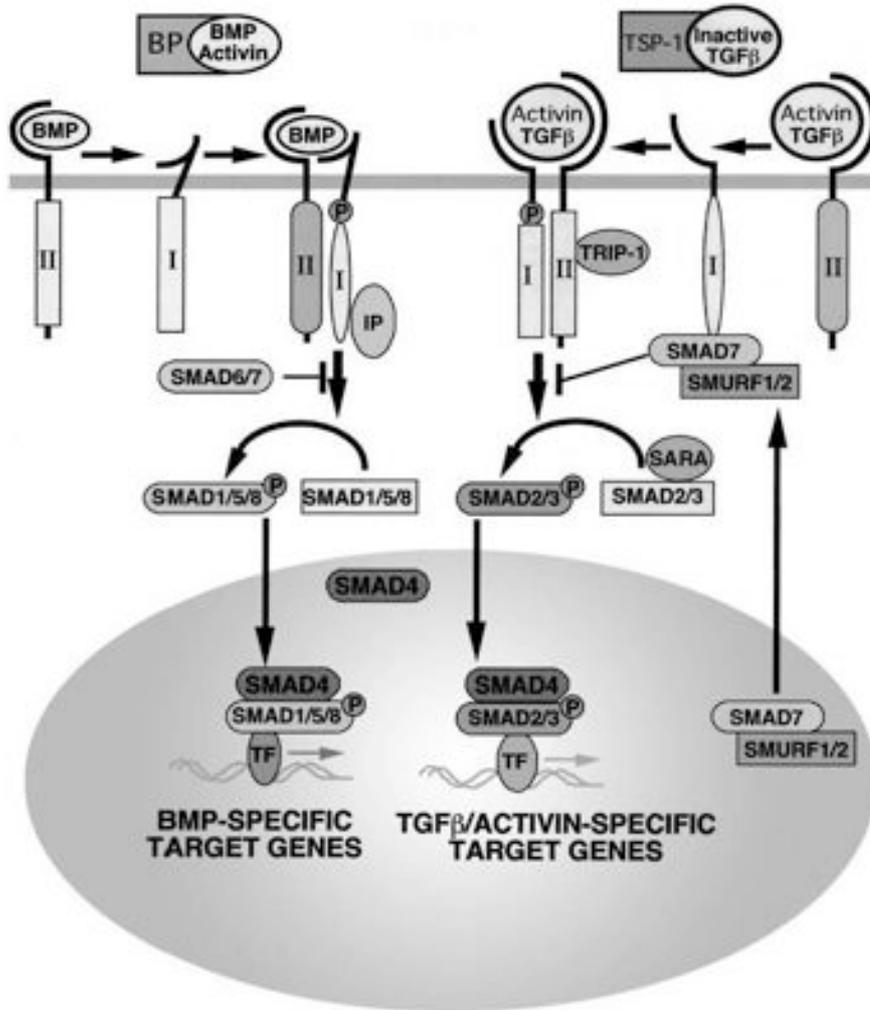


Abb. 3: Die Regulierung der Signaltransduktion (Chang, Brown et al. 2002). Schematische Darstellung der TGF- $\beta$ /Activin bzw. BMP Signalkaskade. Diese beginnt mit der Bindung an Typ II-Rezeptoren, die schließlich Typ I-Rezeptoren phosphorylieren und einen Komplex bilden, der das Signal in das Innere der Zelle weiterleitet. Im Zellinneren binden die intrazellulären Elemente des Rezeptorkomplexes Smad Proteine, deren Bildung mit Hilfe von SARA erleichtert wird. Smad 2/3 Komplexe bzw. Smad 1/5/8 dissoziieren vom Rezeptor und translozieren in den Nukleus. Unter Bindung mit Smad 4 und Transkriptionsfaktoren wird die Transkription von bestimmten Genen aktiviert. Inhibitorische Elemente, wie Smad 6/7, können die Bildung des Smad Komplexes an den Rezeptoren verhindern.

## 1.5.2 Weitere regulatorische Proteine

SARA (Smad anchor for receptor activation) unterstützt die Bildung des Smad 2 und Smad 3 Komplexes mit den TGF- $\beta$  Rezeptoren. Es wirkt so unterstützend bei der TGF- $\beta$  Signalbildung (Tsukazaki, Chiang et al. 1998).

Inhibitorisch wirkt der Pseudorezeptor BAMBI. Diesem Rezeptor fehlen die intrazellulären Eigenschaften des Activin Rezeptors I. Er blockiert also die Wirkung von Activin (Onichtchouk, Chen et al. 1999).

Die Signaltransduktion der TGF- $\beta$  Familie wird auf mehreren Ebenen reguliert. Neben den intrazellulären Smad-Proteinen wird sie auch über extrazelluläre Proteine wie z.B., Noggin's antagonisiert (Groppe, Greenwald et al. 2002). TSP-1 kann TGF- $\beta$  in seiner latenten Form aktivieren und steuert so der Krebsentstehung entgegen (Miao, Seng et al. 2001). Über FKBP12 und Trip-1 existieren noch uneinheitliche Daten. Trip-1 interagiert mit dem TGF- $\beta$  II Rezeptor und wird durch ihn phosphoryliert. Dadurch werden bestimmte Funktionen von TGF- $\beta$  gehemmt oder moduliert. Neben der Interaktion mit TGF- $\beta$  II Rezeptoren scheint es auch mit Smads und bei der Signaltransduktion der TGF- $\beta$  I Rezeptoren zu interagieren (Choy and Derynck 1998). Des Weiteren gibt es auf der Smad Ebene einige Coaktivatoren, die die Bindungsfähigkeit der Smad Proteine an DNA erhöhen. Zwei wichtige Coaktivatoren sind das cAMP-response element binding protein (CREB), das cAMP binding protein (CEB) und das p300. Sie wirken durch Acetylierung von Transkriptionsfaktoren. Sie spielen eine Rolle bei der Bildung von Smad2-Smad4 Komplexen und Smad3-Smad4 Komplexen und aktivieren so die Transkription von Activin und TGF- $\beta$  (Pouponnot, Jayaraman et al. 1998).

Ein weiteres Protein, das Smad4/Smad2 und Smad4/Smad3 bindet, ist FoxH1. Es beeinflusst besonders die Signalkaskade von Activin und spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese (Attisano, Silvestri et al. 2001).

## 1.6 Die Funktionen von Activin und Follistatin

Proteine der TGF $\beta$ -Familie wirken zellsteuernd. Im Gegensatz zu den klassischen Hormonen, deren Funktionen begrenzt sind, und die nur auf bestimmte Zielzellen wirken, haben Proteine der TGF- $\beta$  Familie eine Vielzahl von Funktionen. Die Funktionen der Proteine sind abhängig von der Zielzelle und von dem Status, in dem sich die Zielzelle befindet (Lin and Moustakas 1994).

Activin wird eine Vielzahl von Funktionen und Regulationsmechanismen zugeschrieben und kommt fast ubiquitär im Körper vor. Unter anderem spielt es eine Rolle in der Embryogenese (Matzuk, Kumar et al. 1995), dem Knochenaufbau (Sakai and Eto 2001), der Hämatopoese (Ueno, Nishimatsu et al. 1990), und neben der Reproduktion schließlich auch bei Wundheilung und Entzündung (Munz, Hubner et al. 1999). Dabei ist man von der Vorstellung der aktivierenden Funktion von Activin abgekommen. Es stimmt zwar, dass Activin die Proliferation von CFU-E's (Shao, Frigon et al. 1992) und Fibroblasten (Sakurai, Abe et al. 1994) stimuliert, es hemmt jedoch zum Beispiel das Wachstum von Hepatozyten (Yasuda, Mine et al. 1993) und induziert Apoptose in B, T-Zellen (Hedger and Clarke 1993; Brosh, Sternberg et al. 1995) und Plasmazytomzellen (Sternberg, Honigwachs-sha'anani et al. 1995).

In der Embryogenese wird die  $\beta$ A Untereinheit von Activin vor allem im Herzmuskel, Skelettmuskel, Gehirn und Knochenmark exprimiert, während die  $\beta$ B-Untereinheit eher im Gehirn und den Gonaden exprimiert wird. Interessanterweise scheint im Embryo Activin nicht über den Typ II Rezeptor mit den Zellen zu kommunizieren (Matzuk, Kumar et al. 1995).

Beim Knochenumbau scheinen Activin und Follistatin ebenfalls eine große Rolle zu spielen. Neben der Chondrogenese wirken sie auch in der Umformung von Knorpel zu Knochen mit (Funaba, Ogawa et al. 1996).

Inhibin A unterdrückt die Bildung und Differenzierung von Erythrozyten und Leukozyten auf der Ebene der BFU-E und CFU-GEMM, während Activin sie eher unterstützt. (Broxmeyer, Lu et al. 1988; Hangoc, Carow et al. 1992).

Sowohl Inhibin-, als auch Activin- und Follistatin-Serumspiegel sind natürlichen Schwankungen unterworfen. Diese hängen unter anderem vom Zyklus bei Frauen, als auch vom Lebensalter des Menschen ab (Loria, Petraglia et al. 1998; Muttukrishna, Child et al. 2000). Die genaue Funktion im Zyklus der Frau ist bis jetzt noch unbekannt.

### 1.6.1 Activin und Follistatin in der Entzündung und Wundheilung

Proteine der TGF- $\beta$  Familie haben vielfältige gewebespezifische Wirkungen, die zu Zellproliferation, Differenzierung und einem veränderten Metabolismus führen. Nach Verletzung der Haut konnte eine deutliche Aktivierung von TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 nachgewiesen werden (Ghahary, Shen et al. 1993). TGF- $\beta$  wirkt über die Stimulierung von Fibroblasten und fördert die Produktion von extrazellulärer Matrix in Fibroblasten, Epithelzellen, Mesenchymzellen und Endothelzellen (Pittelkow 1992).

Auch Activin  $\beta$ A und  $\beta$ B spielen eine Rolle in der Wundheilung. Noch mehrere Tage nach einer Verletzung der Haut bei Mäusen konnte sowohl Activin  $\beta$ A, als auch Activin  $\beta$ B im Bereich der Wundränder verstärkt nachgewiesen werden. Während Activin  $\beta$ A vor allem in den Fibroblasten im Bereich der Narbenbildung vermehrt exprimiert wurde, wurde Activin  $\beta$ B vor allem in den Keratinozyten im Bereich der Wundränder gebildet (Hubner, Hu et al. 1996). Eine Rolle in der Wundheilung konnte auch bei transgenen Mäusen, die den funktionellen Antagonisten Follistatin überexprimieren, belegt werden. Diese zeigten nach Verletzungen der Haut Wundheilungsstörungen (Wankell, Munz et al. 2001).

Nach Hirnschädigung konnte ebenfalls eine signifikante Steigerung der Expression von Activin nachgewiesen werden (Munz, Tretter et al. 2001). Weitergehende Untersuchungen zeigten die protektive Wirkung von Activin auf Nervenzellen nach Ischämie bei Ratten (Wu, Lai et al. 1999) und nach neurotoxischer Schädigung (Hughes, Alexi et al. 1999).

Bei vielen Entzündungsreaktionen spielt Activin und Follistatin eine große Rolle (Werner and Alzheimer 2006). Patienten mit interstitieller Lungenfibrose (Matsuse, Ikegami et al. 1996), systemischen Entzündungen (Jones, de Kretser et al. 2004), sowie mit Sepsis und Arthritiden (Yu, Dolter et al. 1998; Gribi, Tanaka et al. 2001) haben einen erhöhten Activin A und Follistatin-Serumspiegel. In vitro induzierte TNF- $\alpha$  und IL-1 die Expression von Activin in Fibroblasten und Keratinozyten (Hubner and Werner 1996).

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte Activin  $\beta$ A verstärkt im Bereich der entzündeten Mukosa und Submukosa nachgewiesen werden, während es im übrigen Gastrointestinaltrakt nicht nachweisbar war (Hubner, Brauchle et al. 1997)

Die komplexen Mechanismen, über die Activin in der Regulierung der Entzündung wirkt, sind aktuell noch nicht endgültig geklärt. Activin wirkt sowohl pro-inflammatorisch, als auch anti-inflammatorisch. Eine erhöhte Activinexpression führt zur Bildung von Prostaglandinen. Nach Stimulation von Makrophagen aus der Ratte mit Activin konnte die verstärkte Bildung von Thromboxan, IL-1 $\beta$ , Prostaglandin E<sub>2</sub>, NO und TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden. Dieser Effekt

war hauptsächlich auf eine Induktion der iNOS und COX-2 zurückzuführen (Nusing and Barsig 1999). In Monozytenkulturen hingegen hemmte Activin A die Produktion von IL-1 $\beta$  und IL-6 (Yamashita, Nakajima et al. 1993). Die genauen Signalwege, über die Activin die Hemmung oder Förderung hervorruft, sind noch nicht verstanden.

Auch für TGF- $\beta$  ist eine Stimulation der COX-2 Expression nachgewiesen (Gilbert, Reddy et al. 1994). Allerdings senkt es im Gegensatz zu Activin die iNOS (Vodovotz, Bogdan et al. 1993).

Bei systemischer Entzündung ist Activin deutlich früher im Serum erhöht als TGF- $\beta$  (Ahmad, Choudhry et al. 1997; Phillips, Jones et al. 2001). Im Schaf konnten bereits eine Stunde nach Gabe von LPS erhöhte Activin-Serumspiegel nachgewiesen werden (Jones, Brauman et al. 2000). Activin und Follistatin ließen sich auch in erhöhter Konzentration im Liquor bei bakterieller und viraler Meningitis nachweisen, jedoch nicht bei an Multipler Sklerose erkrankten Patienten (Michel, Ebert et al. 2000).

### 1.6.2 Activin und Leber

Viele Proteine der TGF- $\beta$  Familie spielen beim Aufbau, der Regeneration und der Funktion der Leber eine Rolle. Auch TGF- $\beta$  und Activin A hemmen die mitogen-induzierte DNA Synthese in Hepatozyten und wirken so als negative Regulationsmechanismen (Yasuda, Mine et al. 1993).

Leberfibrose und Leberzirrhose sind dynamische Prozesse, die durch chronische Leberzellschädigung verschiedenster Etiologien verursacht werden (chemisch, viral, metabolisch oder auch autoimmun). Diese Schädigung manifestiert sich durch einen Untergang von Hepatozyten und vermehrte Bildung extrazellulärer Matrix. Auch bei der Regeneration der Leber spielen Zytokine der TGF- $\beta$  Familie eine wichtige Rolle (Alcolado, Arthur et al. 1997; Qi, Atsuchi et al. 1999).

Innerhalb der Leber ist die Expression von Activin  $\beta$ A relativ niedrig (Schwall, Robbins et al. 1993; Hully, Chang et al. 1994). Die Funktion von Activin  $\beta$ A ist die einer Wachstumskontrolle (Hully, Chang et al. 1994). In vitro und in Mausstudien wurde deutlich, dass Activin A inhibitorisch auf die DNA-Synthese der Hepatozyten wirkt und so wahrscheinlich das Lebervolumen reguliert (Yasuda, Mine et al. 1993). In vitro zeigte sich des Weiteren eine Induktion von Apoptose in Hepatozyten durch Activin  $\beta$ A (Hully, Chang et al.

1994). Auch in vivo konnte eine erhöhte Expression von Activin  $\beta$ A und eine verstärkte Apoptose von Hepatozyten bei Leberzirrhose nachgewiesen werden (Sugiyama, Ichida et al. 1998). Außerdem wurde eine Verminderung der ActRII-mRNA bei CCL induzierter Fibrose in Ratten nachgewiesen (Gold, Francis et al. 2003).

Follistatin, welches die Wirkung von Activin blockiert, konnte bei Ratten in vivo eine Hyperproliferation der Hepatozyten nach partieller Hepatektomie bewirken (Kogure, Omata et al. 1995; Kogure, Zhang et al. 1996). Allerdings konnte in nachfolgenden Studien nachgewiesen werden, dass die Funktionalität der durch Follistatin regenerierten Leber aber nicht wieder voll hergestellt werden konnte (Endo, Maku-Uchi et al. 2006). Klinische Studien zeigten zudem eine Erhöhung des Activin- und des Follistatin-Serumspiegels bei Patienten mit akutem Leberversagen (Lin, Kawakami et al. 2006). Das lässt darauf schließen, dass das Gleichgewicht zwischen Activin und Follistatin in der Kontrolle von Leberentzündung und Fibrose eine Rolle spielt.

Studien an Patienten mit akutem Leberversagen (Hughes and Evans 2003), chronischer Hepatitis B und chronischer Hepatitis C zeigten erhöhte Activin A Spiegel und Follistatin im Serum der Patienten (Patella, Phillips et al. 2001). Bei zunehmender Fibrosierung der Leber nach Schädigung durch Alkohol steigt sowohl der Activin A Spiegel, als auch der Follistatinspiegel (Yuen, Norris et al. 2002). Bei aktuellen Untersuchungen der Kanzerogenese in der Leber wurde vor allem das Gleichgewicht zwischen Activin und Follistatin untersucht. Es zeigte sich, dass in Tumorzellen Follistatin überexprimiert wurde, aber die Expression von Activin  $\beta$ A und Activin  $\beta$ E herunterreguliert wurde. Dies könnte ein Mechanismus der fehlenden Proliferationskontrolle in der Onkogenese sein (Grusch, Drucker et al. 2006).

Neben einer Hemmung des Hepatozytenwachstums führt Activin  $\beta$ A außerdem zu einer Aktivierung von Myofibroblasten und damit zu einer Vermehrung von extrazellulärer Matrix (De Bleser, Niki et al. 1997; Sugiyama, Ichida et al. 1998).

Neben Activin  $\beta$ A scheinen auch Activin  $\beta$ C und Activin  $\beta$ E in der Leber eine Rolle zu spielen. Activin  $\beta$ E wurde bislang in relevanten Mengen nur in der Leber gefunden (Vejda, Erlach et al. 2003), Activin  $\beta$ C in der Leber und Prostata (Mellor, Cranfield et al. 2000). Über ihre Funktionen ist bislang wenig bekannt. Activin  $\beta$ C wirkt im Gegensatz zu Activin  $\beta$ A proliferativ auf Hepatozyten (Gold, Zhang et al. 2005). Es zeigte sich jedoch, dass sie in Hepatom-Zelllinien stark reduziert exprimiert werden (Vejda, Erlach et al. 2003). Dies könnte eine Reaktion auf das ungehemmte Wachstum der Zellen und so ein Mechanismus der Wachstumskontrolle sein.

## 1.7 TGF- $\beta$

Ursprünglich entdeckte man TGF- $\beta$  als Faktor, der Zellwachstum stimuliert (Sporn 1999). 1984 entdeckte man jedoch, dass TGF- $\beta$  Zellwachstum auch inhibieren kann (Tucker, Branum et al. 1984), und ein Jahr später wurde gezeigt, dass TGF- $\beta$  auf die gleichen Zellen stimulierend oder inhibierend wirken kann: Die jeweilige Wirkung ist vom Zusammenspiel mit anderen Faktoren abhängig (Roberts, Anzano et al. 1985). Seit der Klonierung der cDNA für TGF- $\beta$  im Jahre 1985 ist die Zahl der zu dieser Familie gehörenden Faktoren auf über 40 angestiegen (Derynck, Jarrett et al. 1985; Kingsley 1994). In der TGF- $\beta$  Unterfamilie wurden bei Säugetieren die drei Isoformen TGF- $\beta$ 1, 2 und 3 gefunden, deren Sequenzhomologie 80% auf Aminosäureebene beträgt (Gressner, Weiskirchen et al. 2002). Diese Unterformen übernehmen unterschiedliche Aufgaben *in vivo*. Alle drei Isoformen werden als Vorläuferproteine mit einer n-terminalen Signalsequenz, dem latency associated peptide (LAP), und dem TGF- $\beta$  Peptid am C-Terminus sezerniert. In der Kombination mit LAP ist TGF- $\beta$  latent und gilt als inaktiv. Erst durch die enzymatische Abspaltung des LAP's konvertiert das Protein in seine aktive Form. *In vitro* kann diese Abspaltung durch Säure durchgeführt werden, *in vivo* ist die Aktivierung jedoch ein äußerst komplizierter Vorgang der von unterschiedlichen Proteasen übernommen wird (Hyytiäinen, Penttinen et al. 2004). Latentes TGF- $\beta$  kann durch Säure experimentell von dem LAP getrennt werden und so mit dem aktiven TGF- $\beta$  als gesamt TGF- $\beta$  gemessen werden. Im Plasma bindet  $\alpha$ 2-Makroglobulin an TGF- $\beta$  (Wakefield, Smith et al. 1988). Die Halbwertszeit der aktiven Form beträgt 2 Minuten, während die Halbwertszeit der latenten Form 90 Minuten beträgt.

Die biologisch aktive Form ist ein Dimer mit 25kDA, welches aus zwei Untereinheiten besteht, die mit einer Disulfidbrücke verbunden sind. Die einzelnen TGF- $\beta$  Isoformen wirken mit unterschiedlicher Affinität über TGF- $\beta$  Rezeptoren. Es existieren 3 verschiedene transmembranständige Rezeptoren, die eine Reihe von Smad Proteine analog zu der Signalkaskade von Activin initiieren.

Die Funktionen von TGF- $\beta$  sind äußerst heterogen. Fast alle Zellen exprimieren TGF- $\beta$  und alle Zellen besitzen Rezeptoren für TGF- $\beta$  (Brown, Patil et al. 2000). Wichtig ist seine Rolle in der Immunsuppression, der Wachstumskontrolle und der Fibrogenese. Die Auswirkungen von TGF- $\beta$  auf eine Zelle hängen oft von dem Status ab, in dem sich die Zelle befindet.

TGF- $\beta$  spielt eine Schlüsselrolle in der Fibrogenese der Leber (Eng and Friedman 2000; Gressner, Weiskirchen et al. 2002). TGF- $\beta$  ist ein wachstumsinhibierender Faktor für viele unterschiedliche Zellen der Leber (Braun, Mead et al. 1988), kontrolliert die parenchymale Apoptose (Oberhammer, Bursch et al. 1991) und stimuliert die Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix. Eine Schlüsselrolle für die Leberfibrose kommt seiner Wirkung auf die Myofibroblasten zu. Überexpression von TGF- $\beta$ 1 in der Leber führt hauptsächlich durch Aktivierung von Myofibroblasten und Produktion extrazellulärer Matrix zu Fibrosebildung (Sanderson, Factor et al. 1995; Kanzler, Lohse et al. 1999).

Des Weiteren ist TGF- $\beta$ 1 unter bestimmten Bedingungen wachstumsinhibierend. Es wirkt hemmend auf die Tumorentwicklung und Metastasierung in der Leber im frühen Stadium der Tumorentwicklung (Yang, Dukhanina et al. 2002). In vielen Tumoren konnte eine gestörte TGF- $\beta$  Signalübertragung nachgewiesen werden (Stover, Bierie et al. 2007).

TGF- $\beta$  besitzt vielfältige Funktionen, die weit über die Fibrogenese der Leber hinausgehen. Bislang ist wenig über die Interaktionen mit anderen Zytokinen bekannt. Deshalb ist es besonders wichtig die genauen Zusammenhänge der Zellsteuerung durch die TGF- $\beta$  Familie genauer zu verstehen.

## 1.8 Transgene Mausmodelle

Die Proteine der TGF- $\beta$  Familie haben vielfältige Aufgaben in der Entwicklung von Lebewesen (Kingsley 1994). Um zu erforschen, welche Aufgaben die einzelnen Proteine besitzen, entwickelte man eine Reihe von Mausmodellen, die Gene der TGF- $\beta$  Familie überbeziehungsweise unterexprimieren, oder in der Signalkaskade regulatorisch eingreifen.

Da artspezifische Unterschiede hinsichtlich der Funktion der einzelnen Proteine bestehen, kann man die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen. So ist zwar im *Xenopus laevis* eine Mesoderm-induzierende Funktion des Activins nachgewiesen (Massague, Seoane et al. 2005), Activin-defiziente Mäuse zeigen in der Entwicklung jedoch keine Anhaltspunkte für eine solche Funktion. Bei Activin  $\beta$ A Knockoutmäusen sind die Schnurrhaare und die unteren Schneidezähne nicht ausgeprägt, zusätzlich haben sie Fehlbildungen in der Entwicklung des Gaumens. Sie sterben innerhalb des ersten Lebensstages post partum (Matzuk, Kumar et al. 1995). Knockoutmäuse für Activin  $\beta$ B überleben und sind zeugungsfähig, sie weisen jedoch

Defekte im Bereich des Augenlids auf. Weibliche Activin  $\beta$ B Knockoutmäuse können ihre Nachkommen nicht stillen (Matzuk, Kumar et al. 1995).

Activin  $\beta$ A und  $\beta$ B defiziente Mäuse zeigen beide Symptome in ähnlicher Ausprägung wie ihre einfach-transgenen Artgenossen, was darauf schließen lässt, dass bis zum ersten Tag der Entwicklung keine Kompensation oder Überlappung der Funktionen der Proteine stattfindet (Matzuk, Kumar et al. 1995). Activin  $\beta$ B kann in der Embryonal- und Fetalzeit Funktionen von Activin  $\beta$ A übernehmen. Mäuse mit einem Knock-in von Activin  $\beta$ B an Stelle des Activin  $\beta$ A sind lebensfähig. Sie zeigen ein Wachstumsdefizit und haben kurzes struppiges Fell (Brown, Houston-Hawkins et al. 2000).

Auch die Entwicklung der Hoden scheint wesentlich von Activin  $\beta$ A beeinflusst zu werden. Mäuse, die kein Activin  $\beta$ A in den Hoden bilden, haben keine vollständig entwickelten Ducti seminiferi. Activin  $\beta$ B defiziente Mäuse zeigten keine Veränderungen in der Entwicklung des Hodens (Chang, Lau et al. 2001). Allerdings zeigte auch eine Überexpression von Activin  $\beta$ A eine pathologische Veränderung der Hoden, so dass man davon ausgehen muss, dass sowohl die positive, als auch die negative Regulierung des Activinspiegels für die Entwicklung der Hoden von großer Bedeutung ist (Tanimoto, Tanimoto et al. 1999).

Bei weiblichen Mäusen spielt Activin ebenfalls in der Fortpflanzung eine Rolle, so kommt es bei Mäusen, die kein Activin- $\beta$ A bilden können, zu einer verzögerten Reifung der Follikel und einer stark verminderten Fruchtbarkeit (Feijen, Goumans et al. 1994).

## 1.8.1 Die Genregulation

Um eine transgene Maus zu generieren wird eine Transgenkassette hergestellt. Durch geeignete Wahl des Promotors kann bestimmt werden, wo ein Protein überexprimiert wird. In den folgenden Abschnitten werden wichtige Elemente einer Transgenkassette erläutert.

### 1.8.1.1 Der Albumin Enhancer

Enhancer sind Sequenzen in der DNA, die in der Regel weit entfernt vom eigentlich zu transkribierenden Gen liegen. Sie steuern die Transkription. Diese Elemente liegen oft in

Abständen von Tausenden von Basenpaaren vom Promotor entfernt. Der Enhancer kann vor dem Gen, hinter dem Gen oder sogar in den Introns des Gens selbst liegen. Die DNA-Sequenz-Motive sind Bindestellen für Proteine. Transkriptionsfaktoren binden mit hoher Spezifität an die jeweils passenden Stellen im Promotor und Enhancer.

#### 1.8.1.2 Der Albumin Promotor

Damit die RNA-Synthese auch organgebunden stattfindet, sind Promotoren vor die Gene gestellt. Die RNA-Synthetase bindet bevorzugt an Stellen auf der DNA, die vor dem Gen-Anfang liegen. Die Menge an mRNA, die gebildet wird, hängt sehr stark vom Promotor ab. Es gibt spezifische Promotoren, die nur in bestimmten Zellen die Bildung eines bestimmten Proteins zulassen.

#### 1.8.1.3 Das $\beta$ -Globin Intron

Für die Steuerung der Expression ist es wichtig, dass zwischen dem Promotor und dem Gen selbst eine Sequenz liegt, die nicht exprimiert wird.

#### 1.8.1.4 Poly A-Sequenz

Die Poly A Sequenz ist eine Sequenz aus 50-200 oder mehr Adenylresten. Die Funktion dieses Poly A Schwanzes ist wahrscheinlich die Konservierung der mRNA zum Schutz vor enzymatischem Abbau. Somit hat diese Sequenz eine wichtige Funktion bei der Bestimmung der Halbwertszeit der mRNA und steigert so indirekt die Menge des zu exprimierenden Proteins.

### 1.8.1.5 Der bakterielle Vektor

Der bakterielle Vektor ist ein Plasmid, welches für die Generierung der Transgenkassette benutzt wird. Die meisten bakteriellen Plasmide sind aus *E. coli* und enthalten neben einem Resistenzgen einen Promotor, dem eine multiple cloning site folgt. An diese Stelle kann die Expressionskassette inkloniert werden. Diese wird dann vom Bakterium vervielfältigt. Vor der Pronukleusinjektion muss der bakterielle Vektor jedoch von der Kassette wiederum abgetrennt werden, da bakterielle Sequenzen die Expression in der transgenen Maus beeinflussen.

## 1.9 Autoimmune Lebererkrankungen

Als autoimmune Lebererkrankungen werden die autoimmune Hepatitis (AIH), die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) und die primär biliäre Zirrhose (PBC) angesehen. Hinzu kommen sogenannte Overlap Syndrome zwischen AIH und PBC und AIH und PSC, über deren Zuordnung noch Unklarheit herrscht (Schramm and Lohse 2005). Für die autoimmune Genese sprechen die Assoziation mit anderen autoimmunen Erkrankungen, die Assoziation mit bestimmten HLA-Haplotypen und das regelmäßige Vorkommen charakteristischer Autoantikörper (Alvarez, Berg et al. 1999; Czaja, Doherty et al. 2002).

Autoimmune Lebererkrankungen werden wegen der Symptomarmut und dem protrahierten Verlauf oft lange Zeit übersehen. Diese Erkrankungen stellen eine wichtige Differentialdiagnose akuter und chronischer Hepatopathien dar.

### 1.9.1 Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC)

Die primär sklerosierende Cholangitis ist ein chronisch-cholestatiches Syndrom unklarer Ätiologie, das in 3/4 der Fälle mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, meist einer Colitis ulcerosa, assoziiert ist (Ponsioen and Tytgat 1998). Die Prävalenz der Erkrankung liegt bei etwa 10 auf 100.000 Einwohner (Boberg, Aadland et al. 1998). Die PSC ist die einzige autoimmune Lebererkrankung, die häufiger bei Männern als bei Frauen vorkommt (Verhältnis von ca. 2:1). Das Manifestationsalter liegt im jüngeren bis mittleren Erwachsenenalter. Im

späteren Krankheitsstadium führt diese Erkrankung zu einer Fibrosierung der intra- und extrahepatischen Gallengänge und schließlich zur Leberzirrhose (Wiesner, Grambsch et al. 1989).

Die Diagnose der PSC beruht definitionsgemäß auf dem Nachweis einer vernarbenden Cholangitis ohne Vorliegen einer anderweitigen Ursache (Wiesner and LaRusso 1980; Boberg, Aadland et al. 1998). Laborchemisch fällt vor allem ein Anstieg der Cholestasewerte im Blut auf. Nach Ausschluss anderer Ursachen sollte eine bildgebende Diagnostik der Gallenwege erfolgen. Typisch für eine PSC sind ektatische Gallengangsveränderungen, sowie Sklerose und Fibrose oder multifokale Strikturen der Gallengänge. Etwa 5% der Patienten mit einer PSC haben cholangiographisch keine erkennbaren Veränderungen der Gallengänge, zeigen jedoch in der Biopsie typische histologische Veränderungen und auch laborchemisch erhöhte Cholestase-Parameter. Diese Form der PSC wird als small-duct PSC bezeichnet und kann nur histologisch diagnostiziert werden. Weiterhin spielt die Histologie für das Staging der Erkrankung, und somit bei der Einschätzung der Prognose eine Rolle (Poupon, Chazouilleres et al. 2000).

Die PSC ist eine der häufigsten Gründe für chronisch cholestatische Lebererkrankungen des Erwachsenen. Im Gegensatz zur primär bilären Zirrhose (PBC) existiert für die PSC keine effektive medikamentöse Therapie. Urodesoxycholsäure verbessert die Laborparameter, hat jedoch wenig Einfluss auf den Progress der Erkrankung (Lindor 1997). Die immunsuppressive Therapie ist experimentell (Lindor, Wiesner et al. 1991). Dominante Stenosen der Gallenwege können endoskopisch therapiert werden.

Die einzige lebensverlängernde Therapie für Patienten mit PSC ist die Lebertransplantation (Graziadei, Wiesner et al. 1999). Deswegen ist es wichtig, die pathologischen Zusammenhänge der Erkrankung besser zu verstehen, um eine effektive medikamentöse Therapie zu etablieren. Es besteht eine genetische Prädisposition mit den HLA-Typen DR3 und DR52 und einer Reihe anderer HLA-Typen, abhängig von dem ethnischen Hintergrund der Bevölkerung (Spurkland, Saarinen et al. 1999).

Die autoimmune Genese wird durch eine Reihe zellulärer und immunologischer Veränderungen unterstützt. PSC Patienten haben erhöhte Immunglobulinspiegel und unspezifische Auto-Antikörper, sowie Veränderungen im Komplementsystem und zirkulierende Immunkomplexe (van Milligen de Wit, van Deventer et al. 1995).

Die PSC ist eine Präkanzerose. Bei etwa 10-20% der Patienten bildet sich im Laufe der Erkrankung ein Gallengangskarzinom. Diese Form des Krebses ist schwer zu diagnostizieren und hat eine schlechte Prognose (Bergquist, Ekbohm et al. 2002).

Die PSC scheint ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung colorektaler Karzinome zu sein. Bei Patienten mit PSC und einer Colitis ulcerosa kam es 5 mal häufiger zur Entwicklung einer colorektalen Neoplasie als bei Patienten, die nur an einer Colitis ulcerosa erkrankt waren. Die mittlere Überlebenszeit nach der Diagnosestellung beträgt 15 bis 20 Jahre (Bergquist, Ekbom et al. 2002).

### 1.9.2 Autoimmune Hepatitis (AIH)

Die autoimmune Hepatitis ist ebenfalls eine chronisch progressive Erkrankung, deren Prognose unbehandelt ungünstig ist. Die frühe Diagnose und daraufhin einsetzende Therapie ist entscheidend für die Prognose des Patienten. Am häufigsten tritt die Erkrankung bei kaukasischen Europäerinnen auf und verläuft unbehandelt schubweise chronisch und hin zur Leberfibrose und schließlich zur Zirrhose (Feld and Heathcote 2003). Die Prävalenz innerhalb der Bevölkerung wird auf ca. 10 Fälle auf 100.000 geschätzt. Sie scheint allerdings regional gehäuft vorzukommen. So scheint die Prävalenz in Japan höher zu liegen als in der nordamerikanischen und der europäischen Bevölkerung (Chapman, Arborgh et al. 1980).

Auch die AIH tritt häufig zusammen mit anderen autoimmunen Erkrankungen auf, zum Beispiel dem Sjögren-Syndrom, der Colitis ulcerosa und der Autoimmunthyreoiditis. Unspezifische Beschwerden, wie Übelkeit, Arthralgien und ein Ikterus bilden die Klinik der AIH (Obermayer-Straub, Strassburg et al. 2000).

Die Diagnose der AIH ist schwierig, da das klinische und auch laborchemische Bild einer AIH sehr variabel ist. Die Diagnose ergibt sich aus der Zusammenschau von Anamnese und klinischem Befund, Laborbefunden, der Autoantikörper-Serologie und der Histologie. Eine virale Hepatitis muss ausgeschlossen werden (McFarlane 2002). Typisch ist eine selektive Erhöhung des Immunglobulins G oder der  $\gamma$  Globuline. SLA/LP ist der einzige AIH spezifische Auto-Antikörper (Baeres, Herkel et al. 2002). Mit Ausnahme der SLA-Antikörper ist der Nachweis dieser Autoantikörper zur Diagnose einer AIH zwar auf die Erkrankung hinweisend, allerdings nicht beweisend (Kanzler, Weidemann et al. 1999). Die AIH wird immunologisch, je nach serologisch nachweisbaren Auto-Antikörpern in 3 Gruppen eingeteilt. Diese Einteilung in AIH Typ I-III hat jedoch klinisch keine Relevanz.

Die AIH wird mit Corticosteroiden und Azathioprin mit Ansprechraten von über 90% behandelt. Adäquat behandelt lässt sich die Zehnjahresüberlebensrate auf 90% und damit auf

eine normale Lebenserwartung steigern. Bei frustaner medikamentöser Therapie bleibt die Lebertransplantation als ultima ratio (Manns and Vogel 2006).

## 2. Ziele der Arbeit

Die Bedeutung von Activin, Follistatin und TGF- $\beta$  für Entzündungsaktivität und Fibrose bei der PSC und AIH zu untersuchen.

Im Einzelnen sollte untersucht werden:

Die Korrelation von Activin, Follistatin, bzw. gesamt TGF- $\beta$  in Abhängigkeit des Grades der Leberfibrose bei Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis

Die Korrelation von Activin, Follistatin, bzw. gesamt TGF- $\beta$  in Abhängigkeit des Grades der Leberfibrose bei Patienten mit autoimmuner Hepatitis

Die Korrelation von Activin, Follistatin, bzw. gesamt TGF- $\beta$  in Abhängigkeit der Entzündungsreaktion bei Patienten mit autoimmuner Hepatitis

Vorbereitung der Generierung von transgenen Mausmodellen zum Studium der Rolle von Activin und Follistatin in der Leber

Vorbereitung der Generierung von transgenen Mausmodellen zum Studium der Rolle von Activin und Follistatin und T-Zellen

### 3. Materialien

#### 3.1 Geräte

Auflichtmikroskop MZ Apo	Leica, Bensheim
Brutschrank Cellstar	Nunc, Wiesbaden
Computer	Power Mac G4, Apple, Ismaning Compaq EP Series C 333/6.4 Ger, HP Böblingen
Durchlichtmikroskop CK2	Olympus Hamburg
Drucker	HP Laser Jet 2200dtn, HP, Böblingen
Elektrophoreseapparaturen	OWL Scientific über Labotec, Wiesbaden
ELISA Reader	Gigiscan 400 ASYS Hitech, Eugendorf, Austria
Inkubator Certomat H	B. Braun, Melsungen
Kamerasystem	Cybertech CS1 mit Hitachi VM920E- Monitor
Mikrotom HM	Microm, Walldorf
Reinstwasseranlage	MilliQ plus, Millipore, Eschborn
Schüttler Certomat R	B. Braun, Melsungen
Spektralphotometer	9423 Uvg 1002 E, Fischer, Niedereau
Stereomikroskop SZ 40 und AX70	Olympus, Hamburg
Sterilbank Microflow	Nunc, Wiesbaden
Thermodrucker P67E	Mitsubishi, Japan
Thermocycler Techne Genius	Thermo-Dux, Wertheim
UV-Transilluminator	312nm, Renner, Dannstadt
Waagen	ISO9001, Sartorius, Göttingen BP1200
Zentrifugen	Labofuge 400R, Heraeus, Hanau Sorvall Du Pont, Bad Homburg Eppendorf, Hamburg

Gene Pulser Cuvettes	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca USA
Pipetten	Eppendorf Gilson
ND 1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotech GmbH, Erlangen
GenePulser	Bio-Rad, Hercules, Ca USA

### 3.2 Software

MicroWin2000, Mikrotek Laborsystem, Overath

SPSS, SPSS Inc., Chicago, USA

DNA-Strider

Adobe Photoshop

### 3.3 Chemikalien

Chemikalien und Feinchemikalien wurden von den Firmen Biomol, Hamburg; Biozym, Hess Oldendorf; Boehringer Mannheim, Mannheim; Difco, Detroit, USA; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen; Riedel-de Häen, Selze bezogen.

### 3.4 Puffer und Lösungen

PBS	2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 137 mM NaCl
50 × TAE Elektrophorese-Puffer:	2 M Tris/Acetat 50 mM EDTA auf pH 8,0 einstellen
Wasch-Puffer	0,05% Tween20; Sigma, Steinheim in PBS

	pH 7,4
PBS Dulbecco's	GIBCO™, Invitrogen, Karlsruhe
10x DNA-Probenpuffer	30% Ficoll 7,5% SDS 200 mM EDTA 100 mM TrisHCl pH 7,5 0,125% Orange G
LB-Agar	LB-Medium mit 15g/L Agar
LB-Medium	10 g/l NaCl 10 g/l Casein 5 g/l Hefeextrakt auf pH 7,5 einstellen
SOB-Medium	0.5% Hefe Extrakt, 2.0% Trypton 10mM NaCl 2.5mM KCl ad 1 L H <sub>2</sub> O auf pH 7,0 einstellen
TBS	10 mM Tris Base (Hydroxymethylaminomethan) 0,05% TWEEN auf pH 10 einstellen
TE-Puffer	10 mM Tris/HCL pH 8,0 1mMEDTA
Citrat-Puffer	2,94 g Tri-Na-Citrat-Dihydrat (10 mMol) Ad 1 L H <sub>2</sub> O Auf pH 6,0 einstellen
DNA-Injektionspuffer	5 mM Tris/HCl pH 7,4 0,15 mM EDTA pH 8,0 in Ultrapure Wasser
Lösung 1	50 mM Tris-Cl, pH 8,0 10 mM EDTA 100µg/ml RNase A
Lösung 2	200 mM NaOH 1% SDS

Lösung 3	3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5
Equilibrierungspuffer	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH7,0 15% Isopropanol 0,15 % Triton X-100
Waschpuffer	1,0 M NaCl 50mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol
Elutionspuffer	1,25 M NaCl 50 mM Tris-Cl pH 8,5 15% Isopropanol
Puffer RF1	100 mM RbCl 30 mM K-Acetat 10 mM CaCl <sub>2</sub> 50 mM MnCl <sub>2</sub> Glycerin 15% pH 5,8
Puffer RF 2	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl <sub>2</sub> pH 6,8

### 3.5 Wasser

Wasser wurde mit einer Reinstwasseranlage (MilliQ plus, Millipore, Eschborn) deionisiert und anschließend autoklaviert.

### 3.6 Antikörper und ELISA-Kits

Antikörper	Maus anti-human Activin Antikörper,
------------	-------------------------------------

	Serotec, Oxford, UK Biotinylierter Kaninchen anti-Maus IgG <sub>2</sub> Antikörper, Vector Laboratories, Burlingame, USA
ELISA-Kits	Activin, Serotec, UK Follistatin, RnD Systems, Wiesbaden
TGF-β1 ELISA	Biotinylierter Huhn anti-human TGFβ1 Huhn anti-human TGFβ1 Diluent Substratlösung Rekombinantes humanes TGF-β1, R&D Systems, Wiesbaden
TSA™ Fluorescence/Cyanin3 System	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Farbstoff 3342	Höchst, Frankfurt
ABC Biotin/Avidin Block System	Vector Laboratories, Burlingame, USA

### 3.7 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden bei der Firma Genterprise (Mainz) synthetisiert.

IALRT2 – 5'-GGATCCTGAACTTCAGG-3'

IALRT2 bindet im U3 Vektor 686 bp vor der Klonierungsschnittstelle für Activin bzw. Follistatin. Zwischen IALRT2 und der Schnittstelle liegt ein β-Globin Intron.

hCD2neu – 5'-CCCGTAGCCAGCTTTCTTCTG-3'

ist ein forward Primer der etwa 300 bp der Klonierungsstelle für Activin und Follistatin in den hCD2-act und hCD2-mFS Genexpressionskassetten liegt, zwischen dem Gen und dem Insert liegt noch ein hCD2 Intron.

act-üb-r – 5'-GTGATGATCTCCGAGGTCTGCTCC-3'

Act-üb-r ist der reverse Primer, der an Position 412 nach dem ATG im Activin-Gen liegt.

mFs-üb-r – 5'CACTGGGCCCTTCCAGGTGATG-3'

mFS-üb-r bindet im Maus Follistatingen 399 bp nach dem ATG.

### 3.8 Klonierungsvektoren

Als Klonierungsvektoren wurde die hCD2-Expressionskassette (Zhumabekov, Corbella et al. 1995) in einem pBlueskript benutzt. Für das Leberkonstrukt U3 mfs und U3 act wurde eine Albuminpromoterkassette (Labor Blessing) in einem pBR322\*3 auf Grundlage des pBE322 benutzt.

### 3.9 Bakterienstämme

Zur Vermehrung der in Plasmidvektoren klonierten DNA-Fragmente dienten die Bakterienstämme E. coli HB101 und JM10 (Invitrogen, Groningen, Niederlande), sowie Top 10 (Labor Neurath).

### 3.10 Material für die Klonierung

Plasmid Maxi Kit	Quiagen GmbH, Hilden
Plasmid Midi Kit	Quiagen GmbH, Hilden
Endofree Plasmid Kit	Quiagen GmbH, Hilden
Takara DNA Ligation Kit	Takara Shuzo Co., Ltd.
Nucleospin	Macherey-Nagel, Düren
GeneClean II Kit	Qbiogene, USA
1st Strand cDNA Synthesis Kit (AMV)	Roche Applied Sciences, Indianapolis, USA
Tri-Reagent <sup>TM</sup>	Sigma, Saint Louis, USA
Nucleospin Gel-Extraction-Kit	Macherey-Nagel, Düren

### 3.11 Zellen

Zur Austestung der Vektoren wurden Hepa 1,6 (Labor Lohse) und EL4 Zellen (Labor Theobald) benutzt.

### 3.12 Zellkulturmedien und -zusätze

Medien	RPMI 1640, Gibco, Invitrogen, Karlsruhe DMEM, Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Zusätze	Penicillin/Streptomycin, Life Technologies, Eggenbach Fötale Rinderserum, Vitromex, Selters G418
Transfektionsreagenzien	Lipofectamin™ 2000, Invitrogen, Carlsbad, California, USA Fugene, Roche Molecular Biochemicals, Indiana, USA

### 3.13 Sonstige Materialien

Fieberglas Filter	Wallac, Turcu, Finnland
Kunststoffwaren	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA Braun, Melsungen Eppendorf, Hamburg Greiner, Frickenhausen Millicell-CM, Millipore über BD, Heidelberg Nunc, Wiesbaden Schleicher & Schuel, Dassel
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim

Objektträger Polylysine, Superfrost	Menzel-Gläser, Braunschweig
Aquamount	BDH, England
1kb Ladder	Gibco BRL, Eggenstein

## 4. Methoden

### 4.1 Immunologisch

#### Präparation der Seren

Das Blut wurde in Serumentrennröhrchen abgenommen, geschüttelt und 30 min stehen gelassen. Danach wurden die Röhrchen bei 1000g 10 min lang zentrifugiert, bis sich eine Schicht zwischen Serum und festen Bestandteilen des Blutes gebildet hatte. Das Serum wurde in Cryotubes aliquotiert und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  weggefroren.

#### 4.1.2 ELISA

##### 4.1.2.1 Das Prinzip des ELISAs

Mittels des ELISA wird ein Protein aus einer Flüssigkeit quantitativ bestimmt. Dies geschieht in der Regel mittels eines vorher auf einer Plastikplatte adsorbierten Antikörpers, der spezifisch dieses Protein bindet. Alle anderen Proteine, die in der Flüssigkeit vorhanden sind, werden abgewaschen. Ein zweiter Antikörper markiert die an der Platte haftenden Proteine. Dieser zweite Antikörper erkennt ein anderes Epitop des Proteins und ist in der Regel mit Peroxidase gekoppelt. Nach Zugabe eines Substrates kommt es zu einer Farbreaktion, nach der man anhand der Stärke der Färbung auf die Konzentration des Proteins in der Flüssigkeit bestimmen kann. Hat man vorher definierte Mengen des Proteins auf der gleichen Platte gemessen, kann man exakte Konzentrationen mit einer Eichkurve errechnen. Diese Messung geschieht in einem ELISA-Reader, welcher die optische Dichte (OD) der Flüssigkeiten bei einer bestimmten

Wellenlänge misst. Mit Hilfe der optischen Dichte kann dann die Konzentration der Probe ausgerechnet werden.

## Das Prinzip des ELISA's

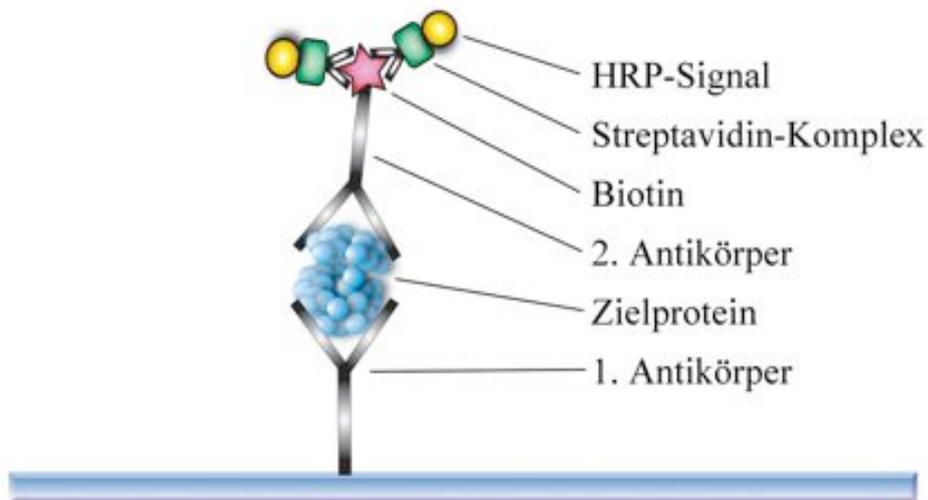


Abb. 4: Das Prinzip eines Elisas

### 4.1.2.2 Activin-ELISA

Je 125µl der Serumproben von Patienten wurden initial mit 125µl Diluent (Albuminlösung) verdünnt. Zu je 125µl werden 125µl 6% SDS-Lösung gegeben. Die Proben werden 3 min bei 100°C im Wasserbad erhitzt. Nach dem Wiedererkalten werden je 20 µl Wasserstoffperoxid (30%) den Proben zugemischt. SDS, das Erhitzen und das Wasserstoffperoxid denaturieren die Proteine und lösen Activin aus seiner Bindung mit  $\alpha_2$ -Macroglobulin und Follistatin.

Die Platten werden mit je 25µl/Well einer Verdünnungslösung vorprepariert. Nun wird in jedes Well je 100µl der vorbehandelten Probenflüssigkeit gegeben. Die Proben werden jeweils doppelt aufgetragen.

Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur werden 25µl Zweitantikörper zu den Proben hinzugegeben. Die Proben werden mit einer Plastikfolie vor dem Austrocknen und vor Kontamination geschützt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Platten 4-mal gewaschen. Zwischen den Waschschritten ruhen die Proben mit dem Wasch-Puffer je 20 Sekunden. Nun wird Avidin-Alkalische Phosphatase zu den Proben gegeben, diese verstärkt die anschließende Färbereaktion. Dann werden die Proben eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach ist es wichtig, den überschüssigen Signalverstärker von den Proben zu waschen. Deshalb müssen die Platten nun 8-mal gewaschen werden, und bleiben dann mit Waschflüssigkeit für 20 min stehen. Danach wäscht man nochmals 3-mal, gibt je 50 µl Substrat in die Wells und lässt die Proben 2 Stunden stehen. Nach zwei Stunden gibt man eine weitere Signalverstärkerlösung auf die Proben und kann nach 20 min mittels 1N H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> die Reaktion stoppen. Nun kann man die Platten in einem ELISA Lesegerät bei 492nm auswerten (Referenzwellenlänge 620 nm).

#### 4.1.2.3 TGFβ1-ELISA

Aktivierung des TGF-β1 zur Messung des gesamt TGF-β1

Zur Messung des gesamt TGF-β1 muss TGF-β1 aus seiner Bindung mit anderen Proteinen herausgelöst werden. Hierzu werden die 20 µl Serum mit 20 µl Eisessig (2,5N) /Urea (10 M) vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wird die Lösung durch hinzufügen von 20µl 2,7 N NaOH/ 1 M HEPES neutralisiert, und der Ansatz mit dem Schüttler durchgemischt. Vor dem Versuch werden die Proben mit Kalibrator Verdünnungsflüssigkeit 20-fach verdünnt (insgesamt 60fache Verdünnung), da eine sehr hohe TGF-β1 Konzentration zu erwarten ist.

Durchführung des ELISA's

96 Reaktionsansätze je Platten (Nunc, Wiesbaden) werden über Nacht bei 4°C mit TGF-β1 Antikörper 0,8 µg/ml in PBS mit 100 µl/Reaktionsansatz beschichtet. Anschließend werden die Platten 1h mit einem Puffer (300 µl/well) bei Raumtemperatur geblockt, 3x mit Wasch-Puffer gewaschen (200 µl/well), 100 µl Probe pro Reaktionsansatz hinzugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wird die Platte mit 100 µl/Reaktionsansatz biotinyliertem Huhn anti- human TGF-β1 Antikörper in einer Konzentration von 0,8 µg/ml in PBS versehen und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Strepavidin-HRP wird

für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, die Platte 3x mit Wasch-Puffer gewaschen und anschließend 100 µl Substratlösung hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20-30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur werden 50 µl 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Reaktionsansatz hinzugefügt. Durch die anschließende Messung der optischen Dichte wird die Menge an gesamt TGF-β1 erfasst.

#### 4.1.2.4 Follistatin-ELISA

In jedes Well einer ELISA-Platte wird 100 µl Verdünnungs- und Blockflüssigkeit (Quantikine, R&D Systems, Wiesbaden Nordenstadt) hinzugefügt. Je 100 µl der ausgewählten Seren wurden auf mit einem Erstantikörper gegen Follistatin beschichtete Platten aufgetragen, und für 3 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurde 200µl Follistatin-Konjugat zu jeder Probe gegeben und die Platten bei 4°C 2 Stunden inkubiert. Das Follistatin-Konjugat ist ein Zweitantikörper, der an Biotin gekoppelt ist. Biotin kann wiederum von mehreren Streptavidin-HRP Komplexen gebunden werden. Eine Farbreaktion kann so verstärkt werden, weil viele HRP Komplexe an einem Antikörper zu einer Signalverstärkung führen. Wiederum werden die Platten viermal gespült, und die Substratlösung hinzugefügt. Bei 37°C werden die Platten nun für eine halbe Stunde inkubiert und die Reaktion mit 50µl 2N Schwefelsäure abgestoppt. Die Proben werden bei 455nm in einem ELISA-Lesegerät gemessen. Als Standard diente rekombinantes humanes Follistatin.

### 4.1.3 Histologie

#### 4.1.3.1 Activin Färbung

Durch immunhistologische Färbungen ist es möglich, in einem Gewebeschnitt spezifisch Proteine, Polysaccharide und andere Strukturen, gegen die Antikörper gebildet werden können, nachzuweisen. Für die Activin-Färbung kam es in dieser Arbeit darauf an, die Expression und die Lokalisierung von Activin in humanen Leberbiopsien nachzuweisen.

Dafür werden die Probenblöcke mit den Leberbiopsien mittels eines Microtoms in 5µm dicke Scheiben geschnitten, und auf Ultrafrost-Objektträgern getrocknet. Nach 24 Stunden Trocknen werden sie 2 mal 5 min in Xylol getaucht, um das Paraffin zu lösen, und dann in einer

absteigenden Alkoholreihe 95%, 75%, 50%, 30%, je 5 min bis in 100% PBS überführt. Die Gewebsschnitte werden 20 min in der Mikrowelle bei 200 Watt Leistung in Natrium-Citratlösung bei 100°C erhitzt, und daraufhin 1 Std. lang abkühlen gelassen. Vor dem Auftragen des Erstantikörpers werden die Proben 20 min mit Trypsin (standardisierte 0,25% Trypsinlösung, Fa. Difco, U.K.) behandelt, um die Epitope des Activins zu demaskieren. Um ein Signal durch endogene Peroxidase zu verhindern, werden alle Biopsien mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS für 20 min inkubiert und danach 3-mal in PBS gewaschen. Die Schnitte werden erneut 2-mal gewaschen und nun für 15 min mit Avidin und daraufhin für 15 min mit Biotin inkubiert. Nach dem Waschen blockt man unspezifische Bindungen in den Gewebsschnitten für 2 Std. bei Raumtemperatur mit einem Pferdeserum. Danach werden die Objektträger mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert und am nächsten Tag 5-mal in PBS gewaschen. Am nächsten Tag werden die Proben 2 Std. bei Raumtemperatur mit dem biotinylierten 2. Antikörper inkubiert. Nach weiteren 5 Waschschritten gibt man Streptavidin auf die Schnitte (1:100) und spült die Proben nach 30 min mit TBS. Schließlich gibt man für 5 min. Tyramid auf die Proben und wäscht wieder 2-mal in TBS. Zum Schluss werden noch die Zellkerne mit Höchst Farbstoff 3342 an (1/2000) gefärbt. Um die Schnitte unter dem Mikroskop betrachten zu können, werden sie mit Aquamount eingedeckelt. Aquamount ist ein Kunstharz, das die Gewebeproben luftdicht verschließt und somit haltbar macht.

Damit die Färbungen nicht verbleichen, sollen sie möglichst wenig Licht ausgesetzt und zügig unter dem Mikroskop betrachtet werden.

#### 4.1.3.2 Das TSA System

Das Tyramid-Signal-Verstärkungssystem basiert auf der katalytischen Aktivität von Meerrettich-Peroxidase und deren Wirkung auf Tyramid. HRP kann Tyramid aktivieren und zur Fluoreszenz anregen, womit das sichtbare Licht verstärkt und der Kontrast erhöht wird (Hunyady, Krempels et al. 1996).

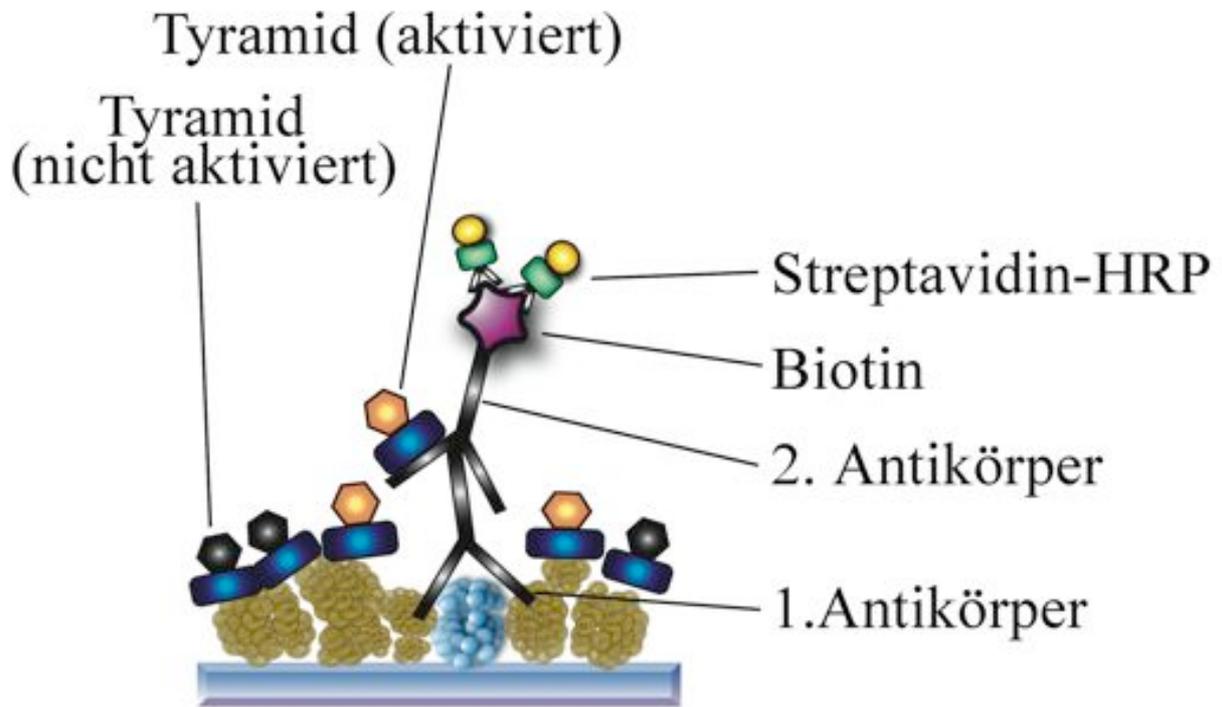


Abb. 5: Das TSA System

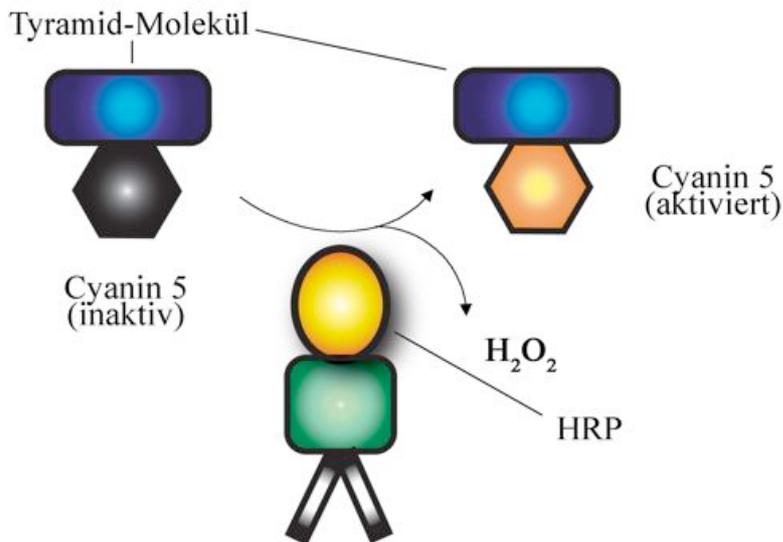


Abb. 6: Aktivierung des Cyanin 5

## 4.2 Klonierungen

### 4.2.1 Plasmide

Wichtige Werkzeuge bei Klonierungen sind so genannte Vektoren. Vektoren sind DNA-Stränge, mit deren Hilfe man fremdes Erbgut in Zellen einbringen kann. Vektoren können mit Plasmiden oder Viren transportiert werden.

Plasmide sind ringförmige doppelsträngige DNA-Stränge in Bakterien, die dort vervielfältigt und aus Bakterien wieder isoliert werden können. Bakterien geben Plasmide bei ihrer physiologischen Teilung an die Tochterzellen weiter. Plasmide werden in der Molekularbiologie im Vorfeld zu experimentellen Zwecken verändert und können Informationen für ein zu exprimierendes Protein enthalten. Klonierungsvektoren werden in Bakterien dazu benutzt, um bestimmte DANN Abschnitte zu vervielfältigen.

Expressionsvektoren werden vor allem dazu benutzt, auf Plasmiden kodierte Gene in andere Zellen einzuschleusen, um dort ein Protein zu synthetisieren.

### 4.2.2 Promoter

Die Promoterregion innerhalb des Genoms ist dafür verantwortlich, wann, in welchem Ausmaß und in welchen Zellen ein Protein hergestellt werden soll. Sie ist sozusagen die Steuerungseinheit des Gens. Promotoren sind meistens wirts- und zellspezifisch. Das heißt, wenn auf einem Plasmid ein Gen mit einem Promotor kodiert wurde, der mausspezifisch und leberspezifisch ist, kann ein Bakterium dieses Protein nicht bilden. Zur Expression kommt es erst dann, wenn die Expressionskassette in eine Leberzelle der Maus gelangt. Neben dem Promotor selbst gibt es noch eine Reihe anderer regulatorischer Sequenzen (wie z.B. Insulatoren und Enhancer), die das Ausmaß der Genexpression innerhalb der Zellen regulieren.

## 4.2.2 Herstellung von kompetenten Zellen

Damit E.coli Zellen DNA-Plasmide aufnehmen können, müssen sie vorbereitet werden. Das heißt, sie müssen kompetent gemacht werden. Dafür werden 400 ml SOB-Medium mit E.coli Bakterien angeimpft und bei 37°C im Schüttler bis zu einer Dichte von  $10^9$  Zellen/ml heranwachsen gelassen. Die bakterielle Konzentration wird mittels eines Photometers bestimmt. Eine optische Dichte von 0,5-0,8 entspricht einer Bakterienkonzentration von  $10^9$ /ml. Nun wird die Bakteriensuspension bei 6000 U und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Die Bakterien werden mit 15ml RF1-Puffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wird die Zellsuspension wiederum bei 6000 U und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abgeschüttet wurde, werden die Zellen in RF-2 Puffer resuspendiert. Nun wird die Suspension 15 min auf Eis inkubiert, und je 200 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Proben werden in flüssigem Stickstoff weggefroren und anschließend bei -70°C gelagert. Um die Kompetenz der Bakterien zu testen, werden sie mit einem Plasmid probetransfiziert und auf Agar-Platten ausgestrichen. Anschließend kann so die Aufnahmeeffizienz bestimmt werden. Kompetente Bakterien können Plasmide aufnehmen und sie vervielfältigen. Sie sind wichtige Werkzeuge der Klonierung.

## 4.2.3 Transformation von Bakterien und Plasmidpräparation

Um Plasmide in großer Menge und Kopienzahl weiterverarbeiten zu können, wurden kompetente E. coli Bakterienstämme mit den Plasmiden für das jeweils zu untersuchende Gen transformiert, auf Agar-Platten mit Ampicillin ausgestrichen und dann für 24 Stunden im Wärmebrutschrank bei 37°C inkubiert. Auf diesen Platten können nur transformierte Bakterien wachsen, die ein Plasmid mit einem Ampicillinresistenzgen besitzen.

Anschließend wurden von der Platte einzelne Bakterienkolonien mit einer Impföse aufgenommen und unter Ampicillinselektion kultiviert. Eine Bakterienkultur geht somit auf ein Bakterium zurück, welches sich innerhalb der 24h im Brutschrank zu einer Kolonie vermehrt hat. Man spricht hierbei auch von einem Bakterienklon, da alle Bakterien dieser Kolonie die identische genetische Information besitzen.

Für die Transformation wurden 100µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, und unter Hinzugabe von 50-100ng Plasmid DNA für 20 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit legt

sich die DNA an die kompetenten Bakterien an, und erlaubt so ein leichteres Eindringen der Plasmide in die Bakterien. Dann werden die Bakterien einem Hitzeschock für 2 min bei 42°C ausgesetzt und anschließend werden 900µl 4°C kalten LB-Mediums hinzugegeben. Durch diese Temperaturunterschiede wird die Bakterienzellwand permeabel und die Plasmid-DNA gelangt in die Bakterien. Während der darauf folgenden 45 min vermehren sich die Bakterien wieder. Nun werden die Bakterien bei 6000 U für 1 min abzentrifugiert. Das LB-Medium wird abgeschüttet und die Zellen in 100µl frischem LB-Medium resuspendiert. Auf LB-Amp Platten werden nun die Bakterien ausgestrichen und in einem Wärmebrutschrank bei 37°C inkubiert.

#### 4.2.4 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse

Die Plasmidpräparation wurde durch alkalische Lyse nach der Methode von Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979) durchgeführt. Von einer einzelnen Bakterienkolonie werden 3ml LB-Amp Medium angeimpft. Die Vorkultur wird im Schüttler bei 37°C für 12 Std. inkubiert. Die in dieser Zeit gewachsenen Bakterien werden nun bei 6.000 U für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wird abgeschüttet und das Pellet in 200µl Lösung 1 resuspendiert. Lösung 1 enthält RNase A, die bakterielle RNA abbaut. Die Bakterien werden nun mit 200µl Lösung 2 lysiert, welche SDS und NaOH enthält, und durch mehrmaliges Invertieren vermischt. Die Hinzugabe von SDS und NaOH führt zu einer Zerstörung der Zellwände. Die genomische Bakterien-DNA bleibt dabei an den Zellwänden hängen, so dass sich in der Lösung nur Plasmid-DNA befindet. Jetzt wird zum abstoppen der Reaktion Lösung 3 hinzugegeben und die Proben leicht durchgemischt.

Die Zellreste werden bei 13.000 U für 10 min abzentrifugiert, und der Überstand mit der Plasmid-DNA in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben. Als nächstes wird der Lösung 800µl Isopropanol hinzugesetzt, um der DNA die Hydrathülle zu entziehen und somit auszufällen. Die Lösung wird 30 min bei 13.000 U abzentrifugiert, das Isopropanol abgeschüttet und das Pellet mit 200µl Ethanol 80% gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation mit 13.000 U, für 30min, werden die Abstände getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgelöst. Danach wird die Konzentration der DNA bestimmt.

Wurden größere und reinere Mengen von DNA gebraucht, wurde das Quiagen-Plasmid-Maxi-Kit benutzt. Hierfür wurde eine größere Menge (400ml für den Klonierungsvektor pBr322#2 (Low-copy) und 250 ml für den Bluescript pBKS (High-copy)) LB-Amp-Medium angeimpft.

Die Präparation erfolgte analog zur oben genannten Methode, nur wurde nach der Neutralisierung durch Lösung 3 und der Zentrifugation die Lösung zusätzlich über eine Säule gereinigt. Hierfür wurden die Säulen erst mit einem Equilibrierungspuffer kalibriert und dann die Plasmidsuspension auf die Säulen gegeben. Während die Suspension durch die Säule fließt, bindet die Plasmid DNA aufgrund ihrer Ladung an die Anionen-Austausch-Matrix (DEAE) der Säulen, andere Verunreinigungen fließen durch die Säule ohne an DEAE zu binden. Nach zweimaligem Waschen wird mittels der hohen Salzkonzentration eines Elutionspuffers die Bindung der DNA an die DEAE gelöst. Die DNA kann daraufhin mit Isopropanol gefällt und mit Ethanol wie oben gewaschen werden.

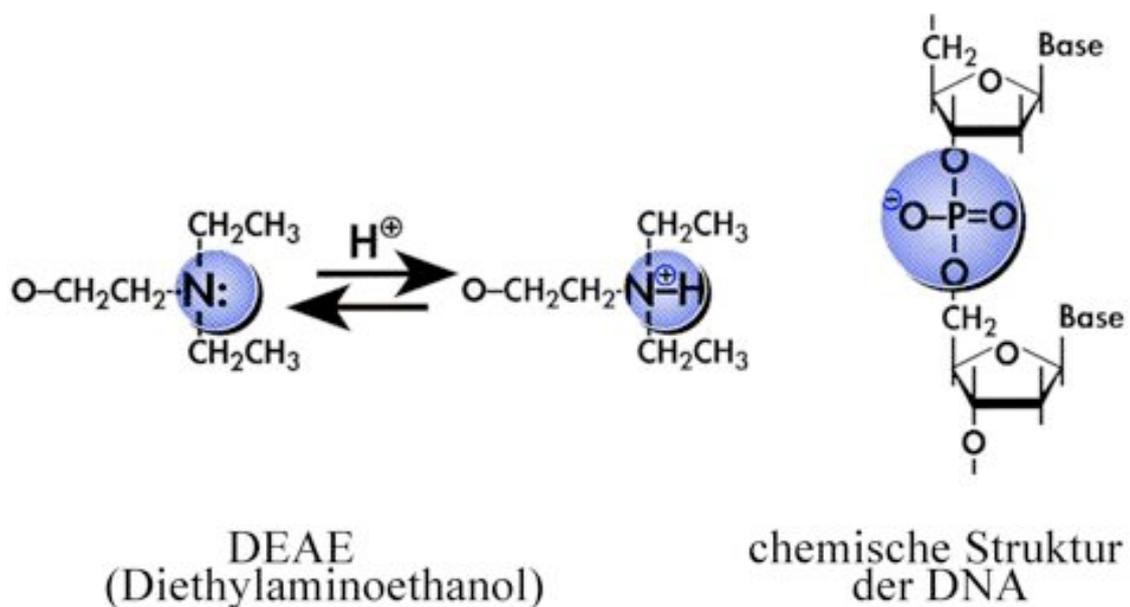


Abb. 7: Die DEAE-Moleküle sind an der Silica-Matrix gebunden und sind positiv geladen. Sie binden die negativ geladenen Moleküle der DNA. (Quelle Qiagen-Maxi Kit Manual, S. 42)

#### 4.2.7 Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA:

Die Bestimmung der Konzentrationen von DNA und RNA wurden mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und auf einem Gel per Bandenvergleich abgeschätzt. Die Referenzwerte des Photometers bei 280 nm und 320 nm signalisieren Verunreinigungen mit Proteinen bzw. Kohlehydraten. Der Quotient der Extinktion bei den Wellenlängen 260nm und 280nm sollte im Idealfall bei 1,8 liegen. Die OD der Proben sollte, um möglichst genau zu

sein, zwischen 0,1 und 1 liegen. Bei der Messung von DNA entspricht eine OD von 1 einer DNA Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Bei der Messung von RNA entspricht eine OD von 1 nur einer RNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

#### 4.2.8 Restriktion mittels Restriktionsenzymen

Um DNA zu schneiden werden Restriktionsenzyme benutzt. Restriktionsenzyme sind Enzyme, die aus Bakterien isoliert wurden und dort als Abwehrmechanismus gegen fremde DNA dienen. Mittlerweile gibt es viele verschiedene Restriktionsenzyme aus unterschiedlichen Bakterien. Jedes Restriktionsenzym erkennt eine spezifische DNA-Sequenz und schneidet diese. Restriktionsenzyme können glatt (blunt-end) oder mit überlappenden Enden schneiden (sticky-end). Sie sind somit wichtige Werkzeuge in der Molekularbiologie. Die Restriktion wurde immer nach dem gleichen Protokoll durchgeführt, 10 mg DNA wurden mit 2  $\mu\text{l}$  NEB Puffer, 1  $\mu\text{l}$  Restriktionsenzym und 16  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  eine Stunde bei 37° C in einem Wärmeschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 15 min bei 60°C inaktiviert und auf ein Gel in einer Elektrophoresekammer aufgetragen.

#### 4.2.9 Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung wurde mit CIP (Calf Intestinal Phosphatase) durchgeführt. Da CIP nicht hitzeinaktivierbar ist, wurde der Reaktionsansatz nach der Dephosphorylierung über ein Gel gereinigt.

Die Dephosphorylierung verhindert, dass der Klonierungsvektor sich bei der Ligation mit dem Insert selbst wieder ligiert, und erhöht somit die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Klonierung.

DNA (geschnittener Vektor)	1 $\mu\text{g}$
Nucleotide (Endkonzentration)	1 mM je dNTP
Reaktionspuffer	2 $\mu\text{l}$
Klenow-Enzym	1 U

H <sub>2</sub> O	auf 20µl auffüllen
------------------	--------------------

Der Reaktionsansatz wurde 15 Minuten bei 37°C inkubiert, und danach über ein Gel aufgereinigt.

#### 4.2.10 Auffüllen überhängender Enden mit Klenow-Enzym

Klenow-Enzym ist ein Enzym, das die überhängenden Enden nach einer Restriktion mit einem Restriktionsenzym wieder auffüllt. Die so behandelten DNA Fragmente können dann in blunt-end Schnittstellen kloniert werden.

#### 4.2.11 Ligation

Ligiert wurde mittels Takara-Ligase. Diese Ligase verbindet DNA-Stücke mit einer sehr hohen Geschwindigkeit. Die Ligation ist 30-mal effizienter, wenn die DNA-Enden überlappend sind (sticky-end) und nicht glatt (blunt-end).

Für die Ligation wurden der geschnittene und dephosphorylierte Vektor und das DNA-Stück im Verhältnis 1:10 gemischt. Dem DNA-Ansatz (10 µl) wurden 50 µl Takara-Lösung A zugegeben und durchgemischt. Nun wurde 10 µl Takara-Lösung B hinzugefügt, durchgemischt und 30 min bei 16°C inkubiert. Der jetzt ligierte Ansatz kann daraufhin in kompetente E. coli Zellen transformiert werden.

#### 4.2.12 DNA-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge zu analytischen und präparativen Zwecken aufgetrennt werden. Die Trennung nach Molekülgröße beruht dabei auf dem Molekularsiebeffekt des Gelmaterials. Dabei hängt der Bereich der Fragmentlängen, die effizient getrennt werden, von der Agarosekonzentration ab. Gele der

üblichen Konzentration von 0,5-2 % Agarose trennen DNA-Fragmente von 0,5-25 kb Größe auf (Sambrook et al., 1989).

Die Nukleinsäuren werden durch Ethidiumbromid visualisiert. Diese Substanz interkaliert in die DNA und wird durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt. Auf je 100 ml 1% Agarose werden 5µl Ethidiumbromid gegeben. Die DNA bzw. RNA Proben wurden mit 6-fach glycerinhaltigem Ladepuffer versetzt, um zu gewährleisten, dass sie in die Ladetaschen im Gel einsinken können.

Zur Auftrennung der DNA-Moleküle nach ihrer Größe wurden ausschließlich 1%ige Agarose Gele (peQ Gold Universal Agarose, peQ Lab Biotechnologie, Erlangen) verwendet. Als Puffer für Gele und Kammer (OWL Scientific über Labotec, Wiesbaden) diente TAE-Puffer, als Marker wurde Hae II geschnittene  $\phi$  X 174 DNA (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 4 Volt pro cm Elektrodenabstand (Netzgerät, Power Pack P25, Biometra, Göttingen). Das Gel wurde anschließend auf einem UV-Transilluminator (312nm, Renner, Dannstadt) mit einem digitalen Kamerasystem (Cybertech CS1 mit Hitachi VM920E-Monitor und Mitsubischi P67E Drucker) dokumentiert.

#### 4.2.13 Gelaufreinigung

Will man ein DNA-Stück aus einem Vektor ausschneiden und weiterverwenden, muss man es nach der Restriktion auf einem Agarosegel vom Vektor trennen und mit einem Skalpell aus dem Gel ausschneiden. Das ausgeschnittene Stück Gel kann dann aufgelöst werden und die DNA freipräpariert werden. Nach einer weiteren Aufreinigung kann die DNA weiterbenutzt (z.B. zum Klonieren) werden.

Zur Gelaufreinigung wurde der Nucleospin Extract Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangabe benutzt. Nach Ausschneiden der gewünschten DNA-Bande aus dem Gel sowie der Gewichtsbestimmung des Stückes wurde das 3fache der Masse des Agarosestückes in Form von Puffer NT1 hinzugefügt und das Gemisch unter ständigem Rütteln auf 50°C erhitzt. Nachdem die Agarosestücke völlig aufgelöst waren, wurde die Gelsuspension auf die Silica-Säulen pipettiert, und abzentrifugiert. Nachdem die positiv geladene Säule mit der negativ geladenen DNA beladen wurde, wurde sie zweimal mit einem Waschpuffer gewaschen und danach durch Zentrifugation getrocknet. Anschließend wurde die DNA mit Wasser von der Säule gelöst.

## 4.3 Zellkultur

### 4.3.1 Transfektion

Die EL-4 Lymphozyten wurden mittels Elektroporation transfiziert. Bei der Elektroporation wird mittels Stromstößen die Membran der Zellen für kurze Zeit durchlässig für die DNA, die so in die Zelle aufgenommen werden kann.

Hierzu wurden 8 mal  $10^6$  Zellen mit den Expressionsvektoren hCD2-mFS bzw. hCD2-Act und einem Neomycin-Resistenzplasmid cotransfiziert. Die DNA-Lösung (zu gleichen Teilen) aus 10 µg Expressionsvektor und 10 µg Neomycin-Resistenzplasmid gemischt. Nun wurden die Zellen in 1 ml Serum in Gene-Pulser Küvetten bei 320 V und 1000 µF elektroporiert. Danach wurden Zellen in RPMI-Medium aufgenommen und nach 5 Stunden Kälberserum zugesetzt.

Die Hepa 1,6 Zellen wurden mittels Lipofectamin<sup>TM</sup>2000 transfiziert. Kurz vor der Transfektion wurden die Zellen abtrypsiniert (standardisierte 0,25% Trypsinlösung, Fa. Difco, U.K.) und in 6-Well Platten neu ausgesät. Pro Well wurden  $10^5$  Zellen transfiziert. 4µg DNA (zu gleichen Teilen Neomycin-Resistenzgen und U3-act bzw. U3-mfs) wurden in 250µl MEM-Medium verdünnt, während 10µl Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000 zur gleichen Zeit mit 250µl MEM-Serum verdünnt, und nach 5 min Inkubationszeit mit der DNA-Lösung gemischt wurde. Nach 20 min wurde das DNA-Lipofectamin<sup>TM</sup> Gemisch auf die Zellen gegeben, nach 24 Stunden wurde das Medium durch frisches MEM-Medium ausgetauscht.

### 4.3.2 Kultur der Lymphozytenzelllinie (EL4) und der Hepatozytenzelllinie (Hepa 1,6)

Beide Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C, feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Die Lymphozytenzelllinie (EL 4) wurde in RPMI-Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin und 5% fötalem Kälberserum kultiviert. Alle 3 Tage wurden die Zellen bei Raumtemperatur, 5 min

lang mit 1500 U abzentrifugiert und zu je einem Fünftel wieder in 20ml frischem Medium ausgesät.

Die Hepatomzelllinie (Hepa 1,6) wurde in DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Fa. Gibco) mit 1% Penicillin/Streptomycin und 5% fötalem Kälberserum kultiviert. Die Zellen wurden alle 5 Tage mit 5ml Trypsin (standardisierte 0,25% Trypsinlösung, Fa. Difco, U.K.) vom Boden der Flaschen gelöst, bei Raumtemperatur 5 min mit 1500 U abzentrifugiert und in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Je ein Drittel der Zellen wurde dann in 20 ml frischem Serum kultiviert.

#### 4.3.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

20 µl Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypanblau gemischt. Die Farbstoffmoleküle des Trypanblau können die intakte Zellmembran nicht durchdringen und ermöglichen so die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen.

Die lebenden Zellen wurden in 16 Quadranten einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Lebendzellzahl/ml errechnet sich wie folgt:

$$(\text{Gezählte Zellen in 16 Quadranten}) \times 10^4 \times 2 \text{ Zellen/ml}$$

Der dimensionslose Faktor 2 entspricht der Verdünnung mit Trypanblau. Bei weiterer Verdünnung durch Zugabe von Medium muss der entsprechende Faktor zusätzlich berücksichtigt werden.

#### 4.3.4 Herstellen stabiler Zelllinien

Um eine stabile Transfektion in Zellen zu erreichen, müssen sich sowohl die Expressionskassette als auch die Sequenz für das Neomycin in das Zielgenom integrieren. Unter Zugabe von G418 wird den Zellen ein Selektionsdruck auferlegt, und nur die Zellen, die transfiziert wurden, können überleben. G418 ist ein Aminoglykosid, das die Proteinbiosynthese in Eu- und Prokaryonten hemmt. In Konzentrationen von 50-100 µg/ml wirkt es zytostatisch

auf die Zellen. In mehreren Passagen wurden die transfizierten Zellen hochgezogen, bis schließlich nur noch transfizierte Zielzellen wuchsen.

G418 wurde zwei Tage in einer Konzentration von 500 µg/ml nach der Transfektion auf beide Zelllinien gegeben.

#### 4.3.5 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen in 1 ml DMEM bzw. RPMI Medium unter Zusatz von 10 % DMSO in Kryo-Röhrchen überführt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen zügig im Wasserbad bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt und anschließend mit Medium gewaschen, um das zytotoxische DMSO zu entfernen.

#### 4.3.6 Kryokonservierung von Bakterien

Zur Kryokonservierung von Bakterien wurde 1 ml Bakterienkultur mit 300 µl 30% Glycerin vermischt und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 4.3.7 RNA-Isolierung

##### 4.3.7.1 EL-4 Zellen

Vor der Isolierung der RNA aus den transfizierten EL4 T-Lymphozyten wurden 500 ng/ml Deoxynivalenol (Vomitotoxin) hinzugefügt. Vomitotoxin erhöht die Stabilität der mRNA in EL-4 Zellen (Li, Ouyang et al. 1997). 20 Std. nach Zugabe von Vomitotoxin wurde die mRNA nach folgendem Protokoll isoliert.

Die Zellen wurden in einem 2ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert, und 1,5 ml Tripure zugefügt. Nun wurden die Zellen durch Schütteln gelöst und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurde die Suspension bei 12.000 U und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt, 300µl Chloroform hinzugefügt und gemischt. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurde das Gemisch bei 12.000 U und 4°C 20 min lang abzentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß gefüllt, 750µl Isopropanol hinzugefügt und die RNA über Nacht bei -20°C gefällt.

Am nächsten Tag wurde die RNA bei 4°C und 12.000 U für 15 min abzentrifugiert, das Präzipitat mit 75% Ethanol gewaschen und in 100µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

Anschließend wurde die Konzentration der RNA im Photometer bei 260nm bestimmt.

#### 4.3.8 Herstellung von cDNA aus RNA

Mittels einer reversen Transkriptase wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. cDNA besitzt im Gegensatz zur genomischen DNA keine Introns mehr und ist eine direkte DNA Kopie der mRNA.

Zur Präparation der Reaktion wurden die sequenzspezifischen Primer IALRT2 und act-üb-r bzw. mFS-üb-r zusammen mit sterilem Wasser und 10-fach Reaktionspuffer, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP's, 50 IU RNase Inhibitor und 20 IU reverse Transkriptase gemischt, und dazu 1µg RNA gegeben. Für die RNA der hCD2 Konstrukte wurden die Primer hCD2 neu zusammen mit den act-üb-r bzw. mFS-üb-r Primern benutzt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur 10 min inkubiert, damit die Primer die RNA binden können. Dann wurden die Proben eine Stunde auf 42°C im Wasserbad erhitzt. In dieser Zeit findet die RNA Transkription statt. Nach der Reaktion wurden alle Proben 5 min auf 99°C erhitzt und dann 5 min auf 4°C abgekühlt, damit die DNA denaturiert, was nachfolgende PCR-Reaktionen erleichtert.

Nun konnte die DNA bei -15°C stabil gelagert werden.

#### 4.3.9 Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (Saiki, Scharf et al. 1985) können Abschnitte in einem DNA-Molekül mit Hilfe von kleinen Oligonukleotiden (Primer) und einem speziellen Enzym, der DNA-Polymerase, gezielt in großen Mengen synthetisiert werden, so dass danach Kopien dieses Genabschnitts in großen Mengen vorliegen. Eine solche Vervielfältigung

ermöglicht es, dieses DNA-Stück, obwohl es nur in geringer Kopienzahl in der Zelle vorlag, mittels einer DNA-Elektrophorese sichtbar zu machen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt, um die optimale Temperatur für das Binden der Primer mit der Ursprungs-DNA festzustellen. Mit einer Gradienten-PCR können verschiedene Annealingtemperaturen ausprobiert werden. Daraus ergaben sich folgende optimalen Annealingtemperaturen:

IALRT2 – act-üb-r	58 °C
IALRT2 – mFs-üb-r	58 °C
hCD2neu - act-üb-r	52 °C
hCD2neu - mFs-üb-r	52 °C
HPRT	55 °C

Durchführung der PCR:

Primerkonzentration: 0,7 µM, Desoxyribonukleotide (dNTPs) 0,25 mM, Polymerase (Red Taq von Sigma) 1 Unit/ Reaktionsansatz, 30 µl Reaktionsvolumen:

Erster Denaturierungsschritt	94°C 3 min
Danach 35 Zyklen Polymerisation	
Denaturierung	94°C 30 s
Annealing (Temperatur s.o.)	40 s
Elongation	72 °C 40 s
Final Elongation	72 °C 5 min

Anschließend wurden die Proben bei 4° C aufbewahrt, bis sie auf ein Agarosegel aufgetragen wurden.

#### 4.3.10 Gelaufreinigung mit dem GeneClean II Kit

Die Gelaufreinigung mit dem GeneClean II Kit erfolgte ähnlich der Gelaufreinigung mit dem Nucleospin Extract Kit. Auch hier wurde das ausgeschnittene Gelstück gewogen, 3-mal das Volumen einer NaCl Lösung hinzugefügt, womit die Agarose bei 55°C für eine Minute

aufgelöst wurde. Zwischendurch wurde immer wieder versucht, durch Vortexen das Agarosegelstück aufzulösen. Nun wurden 10 µl Glaswolle hinzugegeben und das Gemisch für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, während dieser Zeit bindet die DNA an die Glaswolle. Danach wurde die Glaswolle abzentrifugiert. Es wurde mit 500 µl New-Wash Solution zweimal resuspendiert und gewaschen. Die Glaswolle wurde erneut abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Danach wurde das Pellet an der Luft getrocknet bis der Ethanol vollständig verdunstet und das Pellet trocken war. Nun wurde die DNA mit Elutionspuffer von der Glaswolle gelöst, die Glaswolle abzentrifugiert und die gelöste DNA in Lösung vorsichtig abpipettiert. Während der gesamten Arbeit wurde mit gestopften und endotoxinfreien Spitzen gearbeitet, um eine Kontamination mit Endotoxinen zu vermeiden.

## 5. Ergebnisse

### 5.1.1 Die Expressionvektorkassette

Es wurden die Expressionskassetten U3 (Dr. E. Mayer, Universitätsklinik Mainz) und hCD2 (Zhumabekov, Corbella et al. 1995) benutzt. Die Expressionskassette wurde aus ihrem Bluescriptvektor mit Kpn I herausgeschnitten und in den ebenfalls mit Kpn I geschnittenen Klonierungsvektor pBR322#2 (Labor Blessing) kloniert. Dies war nötig, da das mFS-Gen ebenfalls eine Schnittstelle für Kpn I besitzt und die Expressionskassette so nicht im Ganzen herausgeschnitten werden könnte, ohne das Zielgen selbst zu zerschneiden.

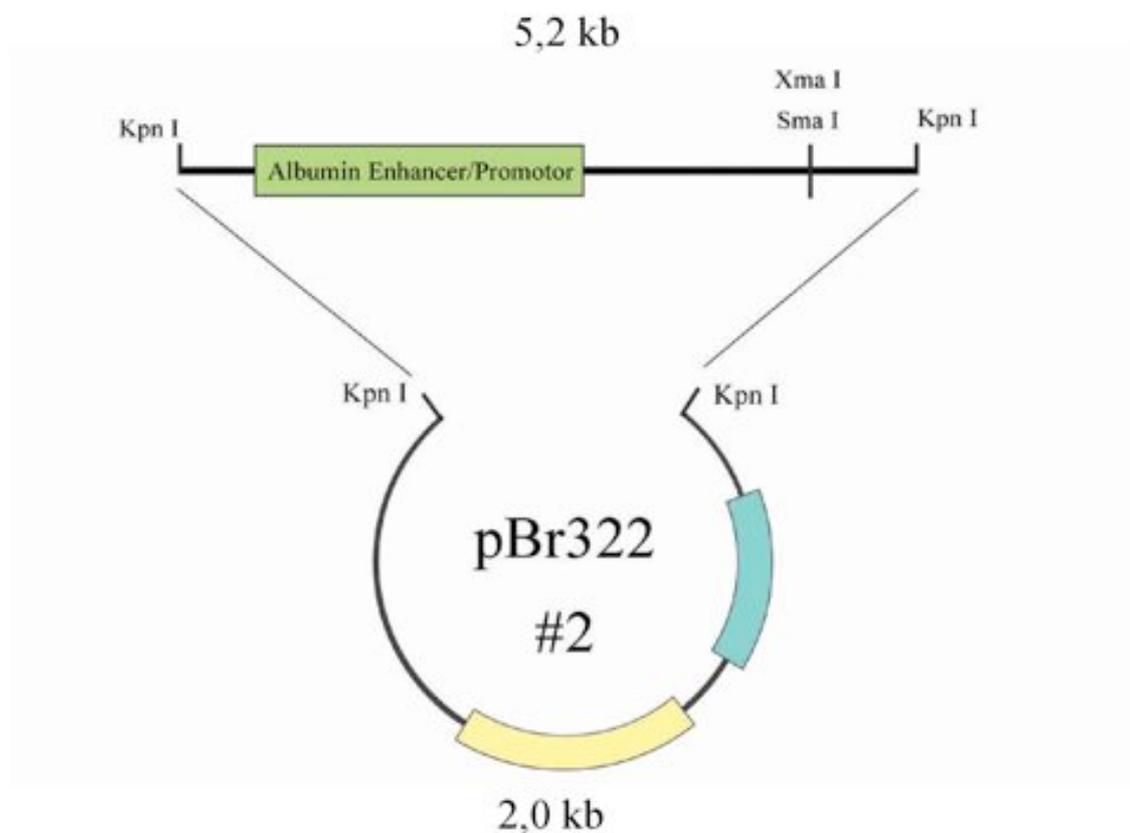


Abb. 8: Die Expressionskassette U3 wurde in die multiple Klonierungsstelle des dephosphorylierten Klonierungsvektor pBr322#2 kloniert.

Der pBr322#2 Vektor wurde mit CIP dephosphoryliert, um zu verhindern, dass sich der Vektor selber wieder ligiert. Durch die Dephosphorylierung wird das Gleichgewicht der Reaktion auf die Seite der Klonierung mit der Vektorkassette geschoben. Zur Ligierung wird mindestens ein Phosphatrest benötigt. So können nur Vektoren entstehen, die das Insert beinhalten.

Hierfür wurden beide Vektoren in einem Gel aufgetrennt. Die spezifische Bande des U3 Vektors wurde bei 6.743 bp ausgeschnitten und aufgereinigt. Anschließend wurden die DNA-Stränge von Insert und Vektor ligiert und in kompetente Bakterien DH5 $\alpha$  transformiert. Von den transformierten Bakterienkolonien wurden 3 ml Kulturen angeimpft und durch Kpn I Verdau auf den Erfolg der Transformation untersucht. Um die endgültige Klonierung vorzubereiten, wurden nun die Vektoren (hCD2, und U3#2) mit Sma I linearisiert und dephosphoryliert. Sma I ist eine blunt-end Schnittstelle, in welche das Zielgen später kloniert werden sollte.



Abb. 9: Nach Restriktionsverdau mit Kpn I ist die U3 Expressionskassette (5,2 kb) mit dem bakteriellen Vektor pBr322 ligiert (2kb) worden. In der linken Gelspur ist als Marker die DNA plus Ladder (NEB) aufgetragen.

## 5.1.2 Präparation des Activin- und Follistatingens

Die Vektoren pCG-IVH  $\beta$ A-Plasmid und PB II KS (+) #20 wurden uns freundlicherweise von Frau Prof. S. Werner, ETH Zürich, zur Verfügung gestellt. Aus dem pCG-IVH  $\beta$ A-Plasmid wurde mit einem Restriktionsverdau (Xba I, Nco I) das Activin-Gen herausgeschnitten. Mit Klenow-Enzym wurden die überhängenden Enden aufgefüllt.

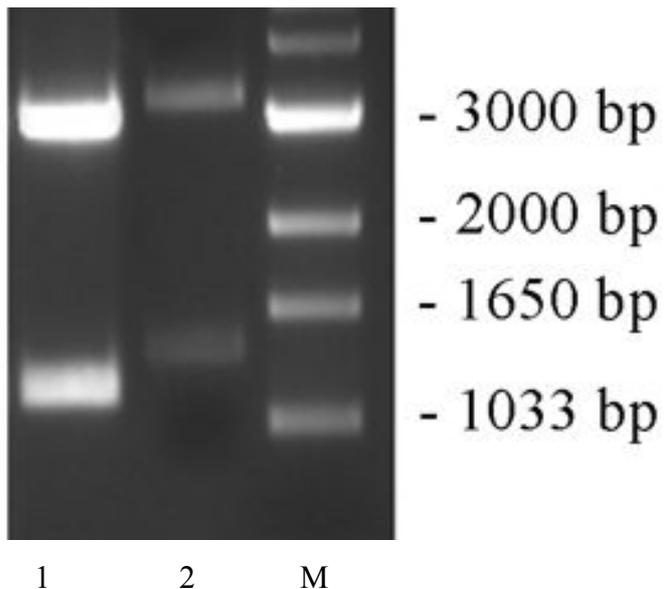


Abb. 10: Originalvektor aus dem das mFS (1) (pB II KS+ mouse Follistatin) bzw. Activin (2) (pCG-IVH hAct) herausgeschnitten wurde. Auf die rechten Spur M wurde die DNA plus Ladder (NEB) aufgetragen.

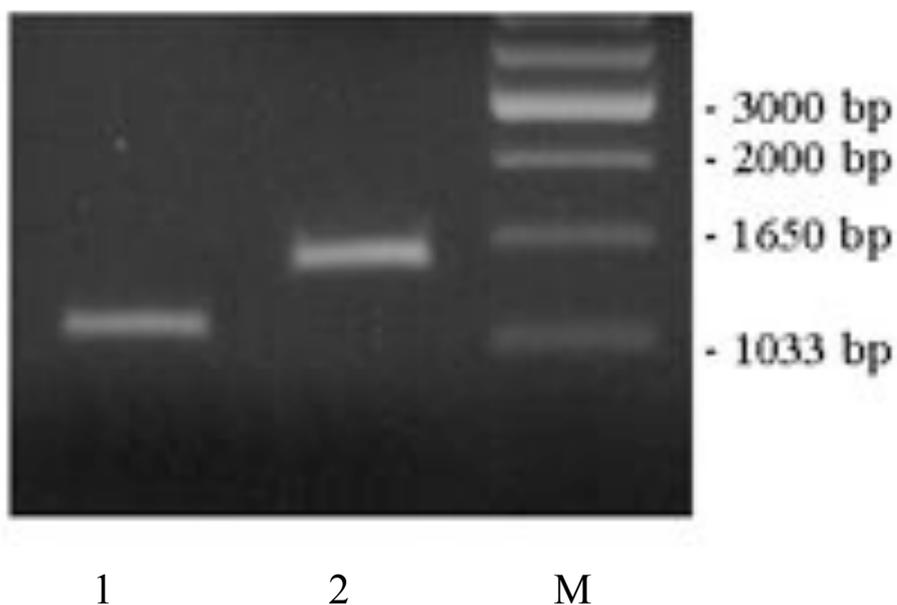


Abb. 11: DNA von Activin und Follistatin nach der Gelaufreinigung. 1 - das mit XmaI geschnittene Follistatin DNA-Fragment, 2 – das mit Xba und NcoI geschnittene Activin-DNA Fragment. Beide Fragmente wurden mit Klenow Enzym zur Klonierung in die SMA I Schnittstelle vorbereitet. M – DNA plus Ladder

Schließlich wurde die Activin-Sequenz in die mit Sma I linearisierten und mit CIP dephosphorylierten Vektoren ligiert.

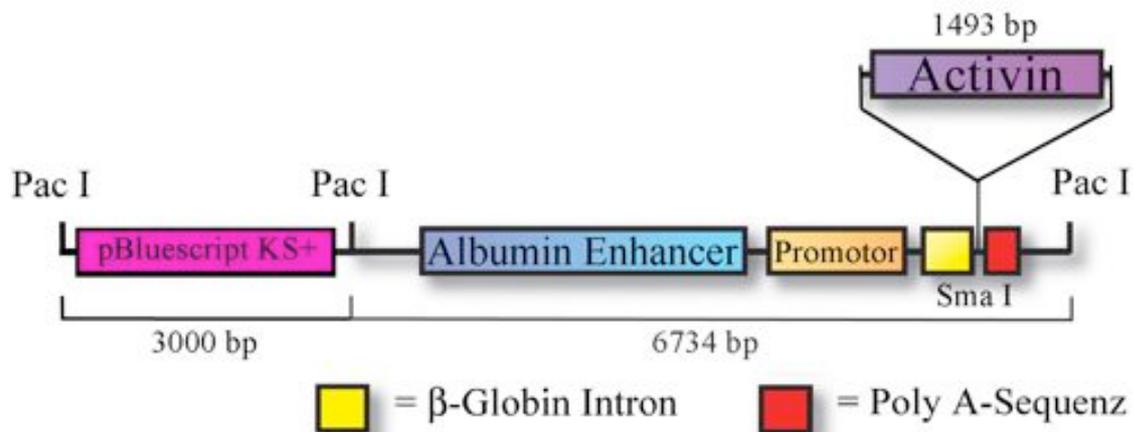


Abb. 12: Klonierung des Activin-Gens in die U3-Expressionskassette.

Aus PB II KS (+) #20 wurde mit Cla I das Maus-Follistatin-Gen herausgeschnitten und in die multiple Klonierungsstelle eines mit Cla I geschnittenen dephosphorylierten pBluescript Vektor KS+ kloniert. Danach wurde das Konstrukt wiederum mit Xho und BamH I herausgeschnitten und umgekehrt wieder eingesetzt. Auf diese Weise hat das nun erhaltene Konstrukt auf beiden Seiten eine Xma I Schnittstelle, mit denen man das Follistatinkonstrukt in die Xma I Klonierungsstelle mit überhängenden Enden klonieren kann. Klonieren mit überhängenden Enden gelingt leichter als Klonieren mit glatten Enden.

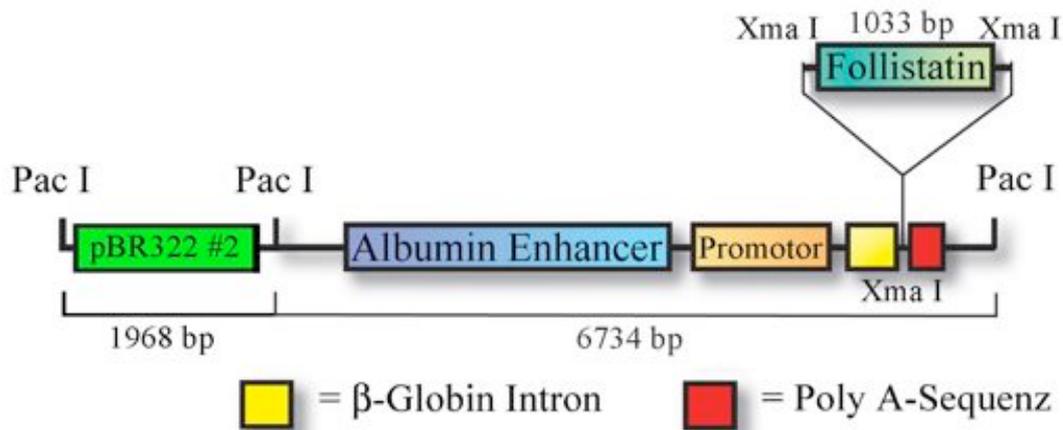


Abb. 13: Klonierung des Maus Follistatin-Gens in die U3-Expressionskassette.

## 5.2 Klonierung der Albuminvektoren

Expressionsvektoren U3-Follistatin und U3-Activin

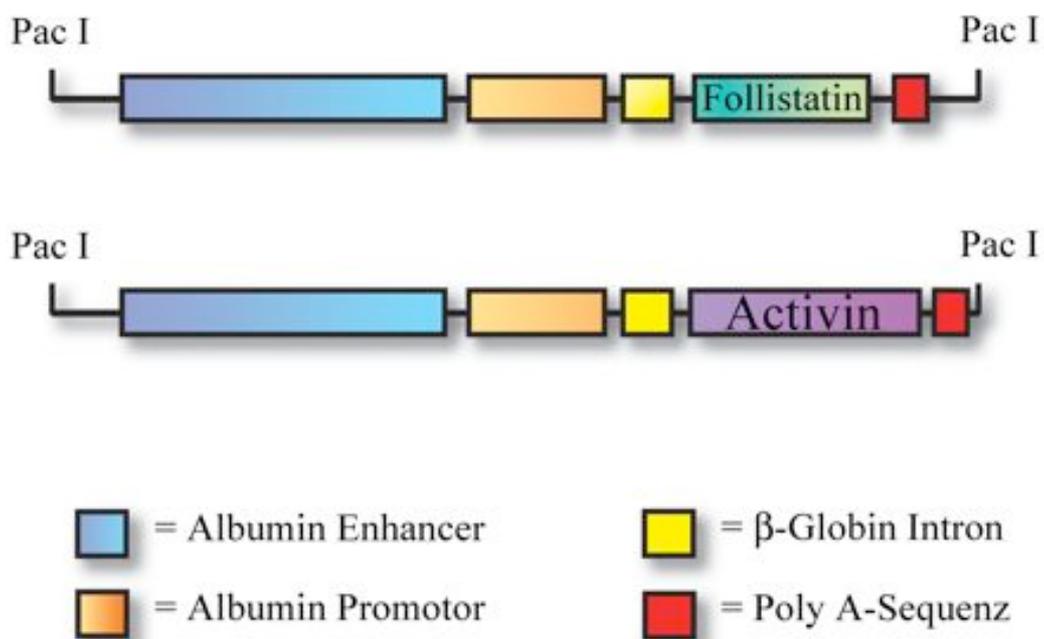


Abb. 14: Die fertig klonierten U3 Vektoren.

### 5.3 Sequenzierung der Albuminexpressionskassetten

Vor der funktionellen Austestung in den Hepatozyten wurden beide Konstrukte partiell sequenziert und mit dem DNA-Strider und NCBI-Blast überprüft.

### 5.4 Funktionelle Überprüfung der Albumin-Konstrukte

Zur Überprüfung der Funktionalität der Konstrukte wurden diese zuvor in Zelllinien getestet. Hierfür wurden zunächst für alle Konstrukte die optimalen Bindungstemperaturen der Primer vorher in Gradienten-PCR's festgestellt. Beide Konstrukte mit dem Albuminpromotor wurden in der Hepa 1,6, einer Maus Hepatozytenzelllinie (Labor Lohse) ausgetestet. Dafür wurden die Konstrukte in die Leberzellen transfiziert, und zur Überprüfung der Expression der transfizierten Zellen eine RT-PCR durchgeführt. Hierbei amplifizierte die PCR über einen Bereich, in dem ein Intron liegt, damit das Gen der Expressionskassette von dem nativen Gen durch die Größe des Fragmentes unterschieden werden kann.

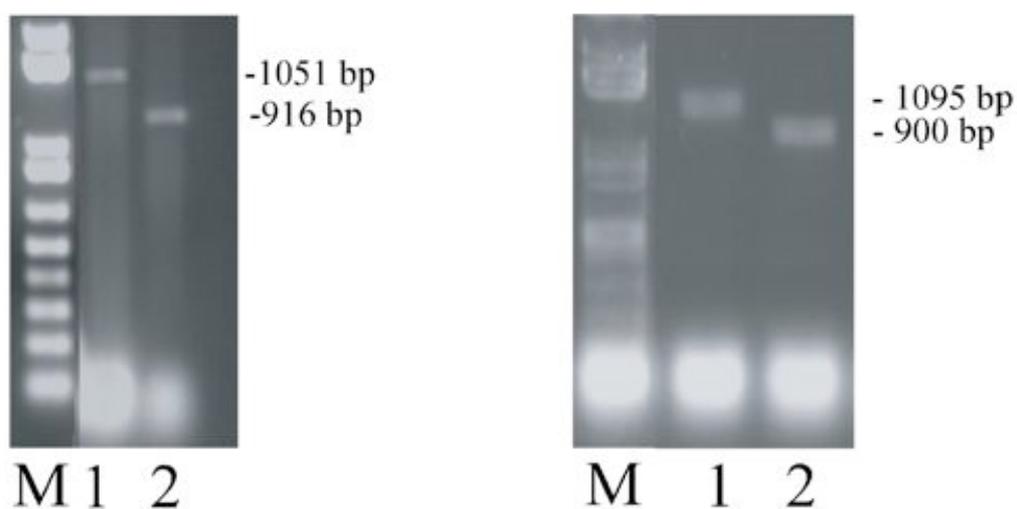


Abb. 15: Funktionelle Austestung der Expressionsvektoren U3-act (links) und U3 mFS (rechts) in Hepa 1,6 Zellen.

Als Marker (M) wurde die 1kB DNA Ladder Plus von NEB benutzt. Spur 1 zeigt den Originalvektor mit PCR über das  $\beta$ -Globin Intron der Expressionskassette. Spur 2 zeigt die RT-PCR in der das Intron nicht mehr vorhanden ist, und bei der das PCR Produkt daher kürzer ist.

## 5.6 Die hCD2 Expressionsvektoren

Expressionsvektoren hCD2-Follistatin und hCD2-Activin

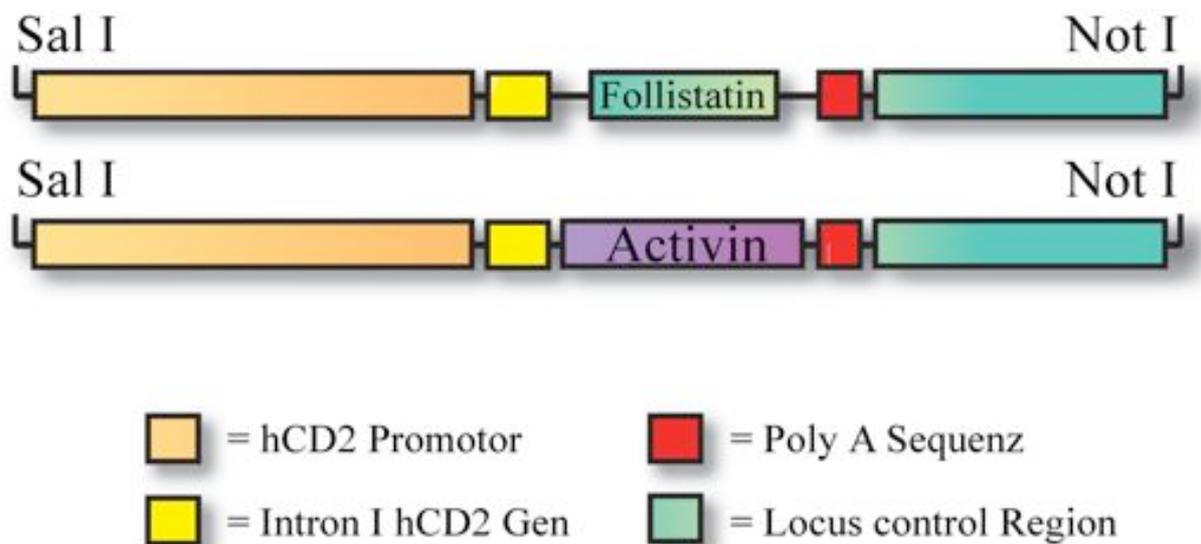


Abb. 16: Schema der fertigen hCD2 Vektoren mit Follistatin und Activin

### 5.6.1 Funktionelle Überprüfung der Vektoren in EL-4 T-Zellen

Um die Funktionsfähigkeit der Vektoren zu überprüfen, wurden die Expressionskassetten in EL-4 T-Zellen transfiziert. Die Zellen konnten das Konstrukt in mRNA transkribieren. Dies konnte mit einer RT-PCR gezeigt werden (Abb.17). Um die mRNA von der DNA zu unterscheiden, wurde die RT-PCR über das  $\beta$ -Globin-Intron, das in der Albumin-Expressionskassette enthalten ist, durchgeführt. Um die optimalen Bindungstemperaturen der Primer herauszufinden, wurde vorher eine Gradienten-PCR durchgeführt, analog der Klonierung der Albuminkonstrukte.

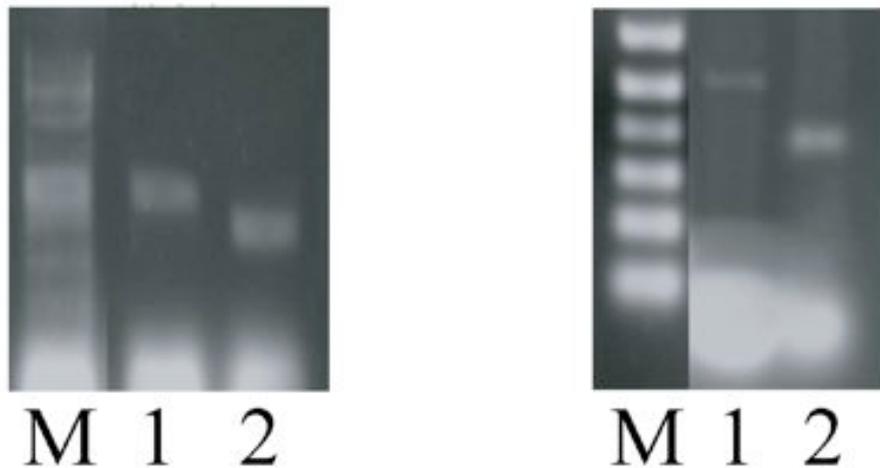


Abb. 17: Funktionelle Überprüfung der hCD2 Genexpressionskassetten. hCD2-act ist auf dem linken Gelbild abgebildet, hCD2 mFS auf dem rechten.

Als Marker (M) wurde die 1kB DNA Ladder Plus von NEB benutzt. Spur 1 Zeigt den Originalvektor mit PCR über das Intron. Spur 2 zeigt die RT-PCR, in der das  $\beta$ -Globin-Intron nicht mehr vorhanden ist, und die deshalb kürzer ist.

### 5.6.2 Aufreinigung der DNA

Um die DNA für die Pronukleusinjektion vorzubereiten, musste sie speziell aufgereinigt werden. Hierfür wurden alle vier Expressionsvektoren erneut transfiziert. Es wurden 200ml Bakterienkulturen mit frischen einzelnen Kolonien angeimpft. Danach wurden die Plasmide mit dem Quiagen Midi Kit (Endotoxfree) sauber aufgereinigt und weggefroren. Dies ist nötig, da schon geringste Verunreinigungen zu einem Absterben der Stammzellen nach Pronukleusinjektion führen.

### 5.6.3 Präparation der Expressionsvektoren

Die Vektoren der Albuminexpressionskassette wurden mit Pst I geschnitten, um den bakteriellen Vektor abzutrennen. Eine zirkuläre DNA hätte bei der Mikroinjektion deutlich geringere Erfolgsaussichten, da es durch eine unkontrollierte Linearisierung des Vektors zu

einem Verlust der Funktionalität des Transgenkonstruktes kommen kann. Auch können Sequenzen aus dem bakteriellen Vektor Einfluss auf die Transgen-Expression nehmen.

Nach dem Enzymverdau wird der bakterielle Vektor gelelektrophoretisch von dem Transgenkonstrukt getrennt. Die Gelbande wurde herausgeschnitten und mit dem Gene Clean II Kit aufgereinigt. Die DNA wurde an Glasbeads gebunden und vorsichtig luftgetrocknet. Schließlich wurde das Pellet mit Mikroinjektions-Puffer aufgelöst.

Die Konzentration wurde zwischen 2 und 3 ng DNA/ $\mu$ l eingestellt. Die Konzentration der verdünnten Injektions-DNA wurde auf einem Gel abgeschätzt und zusätzlich mit dem Nanodrop-Photometer gemessen. Während der gesamten Arbeiten wurden gestopfte Spitzen verwendet um eine Verunreinigung der DNA zu vermeiden.

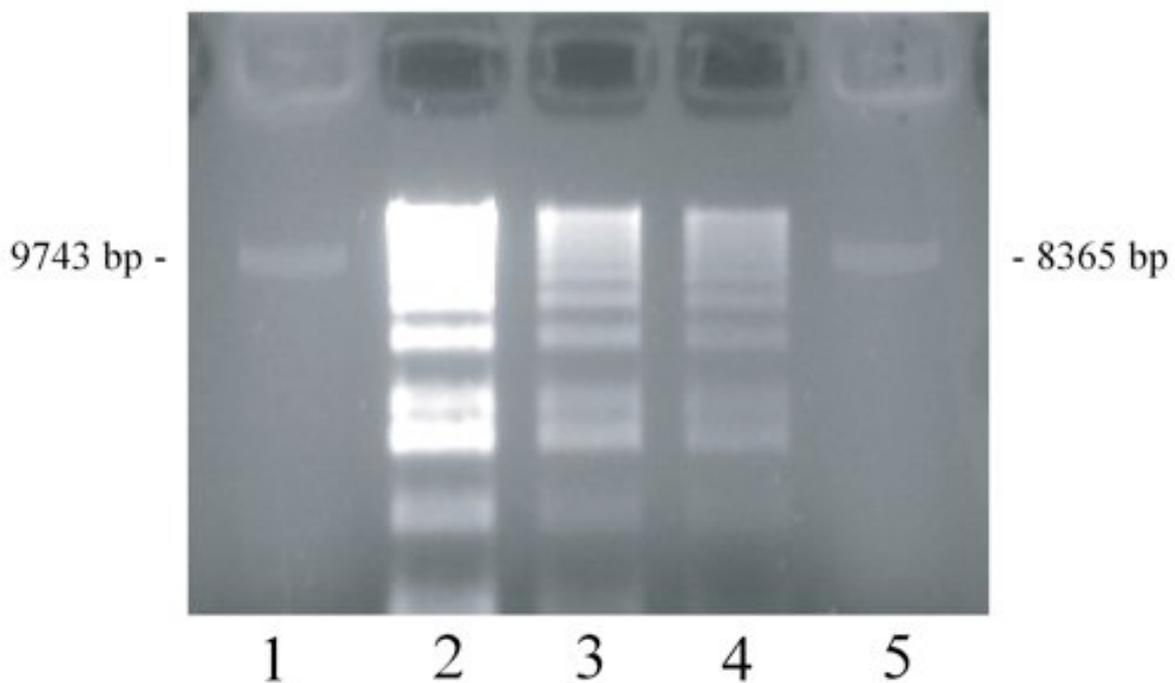


Abb. 18: Expressionskassetten U3 act und U3 mFS nach Abtrennung des bakteriellen Vektors.

Spur 1 zeigt das Albuminkonstrukt mit dem Activin, der bakterielle Klonierungsvektor ist mittels Restriktionsverdau und Gelaufreinigung entfernt worden. Spur 2, 3, 4 sind Marker, die (2 = 30 ng/Bande, 3 = 10 ng/Bande, 4 = 3 ng/Bande) zur Abschätzung der Konzentration der Vektoren verwendet werden. In Spur 5 wurde das Albuminkonstrukt mit dem mFS aufgetragen.

## 5.7 Analyse der Serumspiegel von Activin und Follistatin

### 5.7.1 Serumproben der gesunden Probanden

Es wurden Seren von 10 gesunden Probanden benutzt, die in Alter und Geschlechtsverteilung ungefähr dem Patientenkollektiv der AIH- und PSC Patienten entsprachen. In der Probandengruppe waren 6 Frauen und vier Männer mit einem Altersmittel von 35,4 Jahren. Es waren keine chronischen Erkrankungen bei den Probanden bekannt.

### 5.7.2 Serumproben der Patienten mit einer chronischen Hepatitis C

#### 5.7.2.1 Charakterisierung der Patienten mit Hepatitis C

Als Patientenkontrollgruppe wurden 20 Probanden mit einer chronischen Hepatitis C ausgesucht, die in ihrer Zusammenstellung bezüglich Alter und Geschlechtsverteilung der Gruppe der PSC Patienten und der AIH Patienten ähnlich war. Die HCV Patienten wurden nach dem Fibrosegrad (Ishak, Baptista et al. 1995) in zwei Gruppen unterteilt:

	Gruppe 1	Gruppe 2
Verhältnis Mann : Frau	4:6	4:6
Mittlerer Fibroscore	0-2	4-5
Altersdurchschnitt:	37 Jahre	36,4 Jahre

#### 5.7.2.2 Charakterisierung der Patienten mit AIH und PSC

Ein Ziel der Studie war es, die Serumspiegel von Activin  $\beta$ A, TGF- $\beta$ 1 und Follistatin in Abhängigkeit des Fibrosegrades bei Patienten PSC zu vergleichen.

Aus der Serumbank wurden Seren ausgesucht, die zum Zeitpunkt der Histologiegewinnung entnommen wurden. Es wurden 2 Gruppen gebildet, die nach dem Fibrosegrad eingeteilt wurden. Der Fibrosegrad wurde nach Ludwig (Ludwig, Barham et al. 1981) anhand der Histologien bestimmt.

Patienten mit PSC:

	Gruppe 1	Gruppe 2
Verhältnis Mann : Frau	13:10	10:10
Mittlerer Fibrosescore	0-1	3-4
Altersdurchschnitt:	34,4 Jahre	35,5 Jahre

Patienten mit AIH:

	Gruppe 1	Gruppe 2
Verhältnis Mann : Frau	3:14	1:9
Mittlerer Fibrosescore	0-1	3-4
Altersdurchschnitt:	37,3 Jahre	49,1 Jahre

### 5.7.2.3 Charakterisierung der Seren der Patienten mit AIH

Ein Ziel der Untersuchung war es, die Serumspiegel von Activin  $\beta$ A, TGF- $\beta$ 1 und Follistatin in Abhängigkeit der Entzündungsaktivität bei Patienten mit AIH zu vergleichen. Aus der Serumbank wurden Serumpaare ausgesucht, die zum Zeitpunkt der Entnahme hohe bzw. niedrige Entzündungsparameter aufwiesen. Hierbei wurde als Surrogat für die Entzündliche Aktivität die GPT bestimmt. Bei einer GPT von über 100 U/ml wurde eine hohe entzündliche Aktivität angenommen, bei einer GPT von unter 30 U/ml eine AIH in Remission.

Verhältnis Mann : Frau	4:23
Mittlere GPT Remission	22 U/ml

bzw. akuter Schub	bzw. 257 U/ml
Altersdurchschnitt:	46,6 Jahre

### 5.7.6 Statistische Auswertung

Zum statistischen Vergleich der Patientengruppen wurde der Wilcoxon-test (statistischer Vergleich der Entzündungsseren), sowie der Mann-Whitney U Test (statistischer Vergleich der Fibroseseren) angewendet. Als signifikant wurde ein p-Wert kleiner 0,05 definiert.

### 5.8 Korrelation von Activin-, Follistatin- und gesamt TGF- $\beta$ Serumspiegeln bei Patienten mit einer PSC in Abhängigkeit des Fibrosegrades

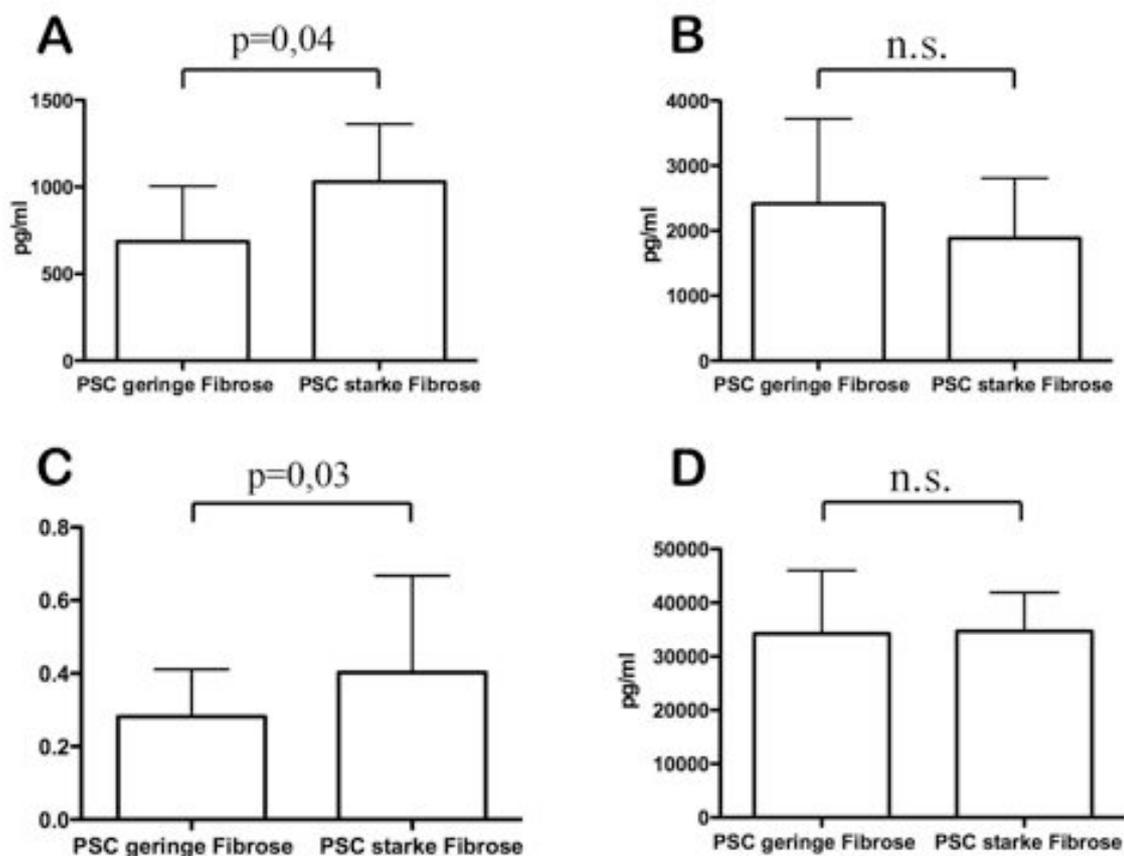


Abb. 19: A: Einfluss des Fibrosegrades auf Activin-Serumspiegel bei Patienten mit einer PSC. Der Activinspiegel war bei Patienten mit einer PSC und starken fibrotischen Veränderungen der Leber signifikant erhöht gegenüber der Patientengruppe mit geringen fibrotischen Veränderungen der Leber. - Abb. B: Einfluss des Fibrosegrades auf Follistatinspiegel bei Patienten mit einer PSC. Die Follistatin-Serumspiegel nahmen in Abhängigkeit der Fibrose tendenziell ab. - Abb. C: Der Quotient aus

Activin/Follistatin bei PSC - Abb. D: Einfluss des Fibrosegrades auf gesamt TGF- $\beta$ -Spiegel bei Patienten mit einer PSC. Es wurden keine signifikanten Unterschiede der gesamt TGF- $\beta$ -Serumspiegel in Abhängigkeit der fibrotischen Veränderung bei Patienten mit einer PSC nachgewiesen.

Da Activin bei der Fibrosebildung eine Rolle spielen könnte, wurden die Serumspiegel von Activin bei PSC-Patienten mit einer geringen Fibrose und Patienten, die bereits starke fibrotische Veränderungen der Leber hatten, verglichen. Es fand sich eine signifikante Erhöhung der Activinspiegel bei starker Fibrose (Gruppe 2) (1028,7 pg/ml) verglichen mit den Activinspiegeln der Gruppe mit geringen fibrotischen Veränderungen (Gruppe 1) (685,8 pg/ml;  $p = 0,04$ ). Der prozentuale Anstieg betrug hier 50%.

Für Follistatin-Serumspiegel konnte kein signifikanter Unterschied bei Patienten mit starker Fibrose verglichen mit der Patientengruppe mit geringer Fibrose festgestellt werden (2415 pg/ml vs. 1884 pg/ml,  $p = 0,15$ ). Während die Activinspiegel mit zunehmender Fibrose anstiegen, nahmen die Follistatinspiegel um 22 % ab.

Da Follistatin und Activin antagonistisch wirken, wurde der Quotient von Follistatin und Activin bei den verschiedenen Erkrankungen verglichen. Dies könnte einen Hinweis geben auf die Rolle des Gleichgewichtes zwischen beiden Proteinen in der Entstehung der Leberfibrose. Hier zeigte sich, dass der Quotient aus Activin und Follistatin bei starker Fibrose (Median 0,4026) signifikant gegenüber dem bei geringer Fibrose (Median 0,2816) erhöht waren ( $p=0,028$ ). Dies bedeutet eine Verschiebung des Verhältnisses hin zu dem profibrinogenen Activin.

Für die Gesamt-TGF  $\beta$ -Spiegel zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von Leberfibrose bei PSC (34210 pg/ml vs. 34660 pg/ml,  $p = 0,742$ ). Dies entspricht einem prozentualen Anstieg von 1,3%.

## 5.9 Vergleich von Activin-, Follistatin- und gesamt TGF- $\beta$ Serumspiegeln bei Patienten mit einer AIH in Abhängigkeit des Fibrosegrades

Patienten mit einer AIH zeigten ebenfalls einen signifikanten Unterschied des Activin-Serumspiegels in Abhängigkeit der fibrotischen Veränderung der Leber. Activin-Serumspiegel waren in Gruppe 1 (311,2 pg/ml) niedriger als in Gruppe 2 (492,9 pg/ml,  $p=0,03$ ). Dies entsprach einem prozentualen Anstieg von 58%.

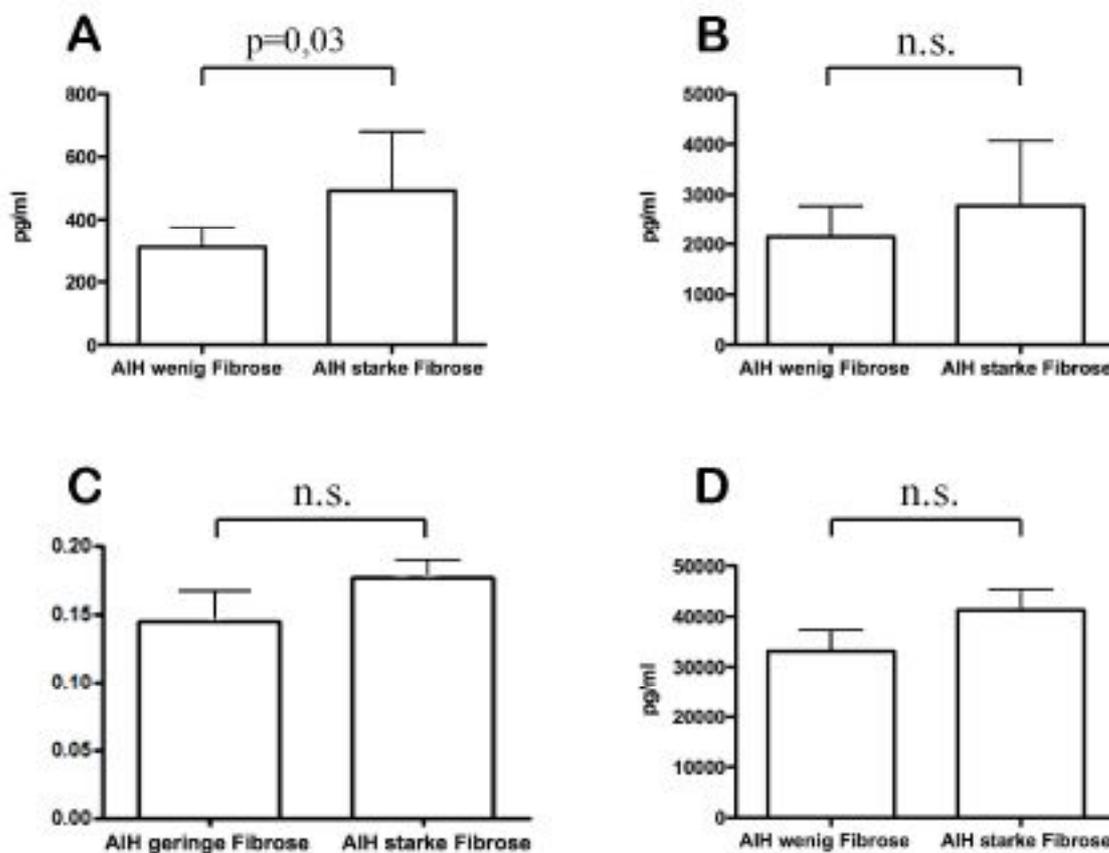


Abb. 20: A: Einfluss der Fibrose auf Activin-Serumspiegel in Abhängigkeit des Fibrosegrades bei Patienten mit einer AIH. - B: Einfluss der Fibrose auf Follistatin-Serumspiegel in Abhängigkeit des Fibrosegrades bei Patienten mit einer AIH. - C: Quotient aus Activin und Follistatin bei Patienten mit autoimmuner Hepatitis in Abhängigkeit der Fibrose – D: Einfluss der Fibrose auf gesamt TGF- $\beta$ -Serumspiegel in Abhängigkeit des Fibrosegrades bei Patienten mit einer AIH.

Auch für Follistatin konnte ein Anstieg um 30 % nachgewiesen werden. Dieser Anstieg unterscheidet sich allerdings nicht signifikant zwischen den Gruppen (2144pg/ml vs. 2781

pg/ml,  $p=0,21$ ). Der Quotient aus Activin und Follistatin war bei Patienten mit autoimmuner Hepatitis bei geringer Fibrose (Median 0,22) und starker Fibrose (Median 0,23) ebenfalls nicht signifikant verschieden ( $p=0,98$ ).

Das Gesamt TGF- $\beta$  war in beiden Gruppen nicht signifikant erhöht (33100 vs. 41180,  $p=0,17$ ). Dies entspricht einem prozentualen Anstieg von 24 %.

## 5.10 Vergleich der Serumspiegel von Activin, Follistatin und Follistatin bei Hepatitis C, PSC und AIH

### 5.10.1 Activin- Serumspiegel bei Patienten mit einer PSC, chronischen Hepatitis C und AIH im Vergleich

Um herauszufinden, welchen Einfluss die Fibrose an sich auf den Activinspiegel hat, wurde neben den an PSC und an AIH erkrankten Patienten zwei Kontrollgruppen untersucht: Gesunden Probanden, sowie Patienten, die an einer chronischen Hepatitis C erkrankt waren. Diese Gruppen wurden dann miteinander verglichen.

Patienten mit einer PSC (Median 685,8 pg/ml,  $p<0,001$ ) und Patienten mit einer chronischen Hepatitis C (Median 819,8 pg/ml,  $p<0,001$ ) mit geringer Fibrose hatten einen signifikant erhöhten Activin-Serumspiegel, verglichen mit gesunden Probanden (Median 267,5 pg/ml). Die Kontrollgruppe von Patienten mit chronischer Hepatitis C keinen signifikant erhöhten Activin-Serumspiegel (Median 819,8 pg/ml), verglichen mit den Patienten mit einer PSC (Median 685,8 pg/ml,  $p=0,3$ ). Patienten mit einer AIH und geringer Fibrose hingegen zeigten einen niedrigeren Activin-Serumspiegel (Median 311,2 pg/ml), als die Patienten mit PSC ( $p=0,03$ ) und Hepatitis C ( $p=0,01$ ). Der Serumspiegel von AIH-Patienten mit geringer Fibrose war vergleichbar mit dem gesunder Probanden.

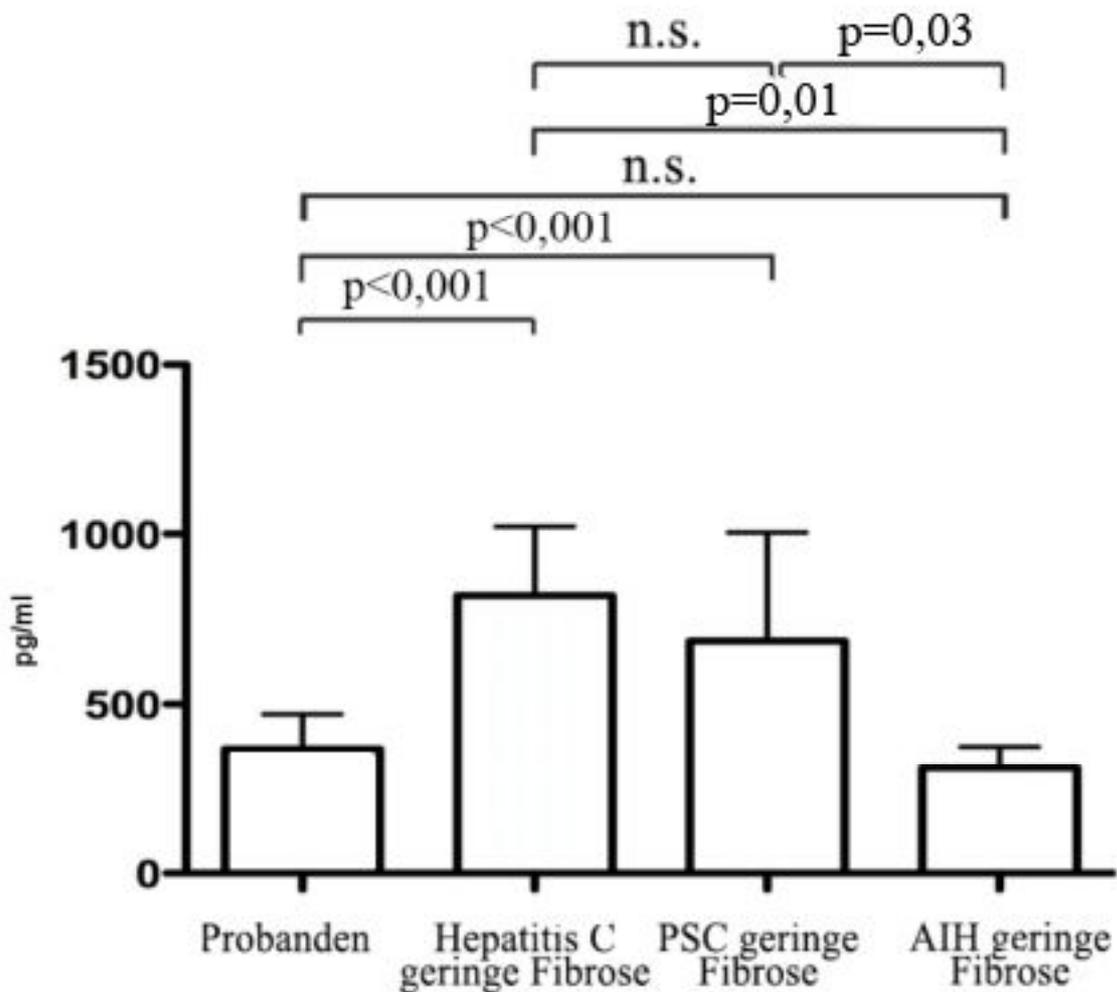


Abb. 27: Activin-Serumspiegel bei Patienten mit geringen fibrotischen Veränderungen der Leber.

Sowohl bei Patienten mit einer PSC (Median 1028 pg/ml,  $p < 0,001$ ), einer AIH (Median 493 pg/ml,  $p = 0,04$ ), als auch bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C (Median 880 pg/ml,  $p < 0,001$ ) und fortgeschrittener Fibrose der Leber war der Activin-Serumspiegel verglichen mit gesunden Probanden (Median 367,5) erhöht. Die Unterschiede zwischen der Hepatitis C Gruppe und PSC Patienten waren nicht signifikant ( $p = 0,45$ ), allerdings zeigte sich ein signifikant höherer Activin-Serumspiegel bei Patienten mit chronischer Hepatitis C ( $p = 0,005$ ) und mit PSC ( $p = 0,003$ ) verglichen mit Patienten mit AIH.

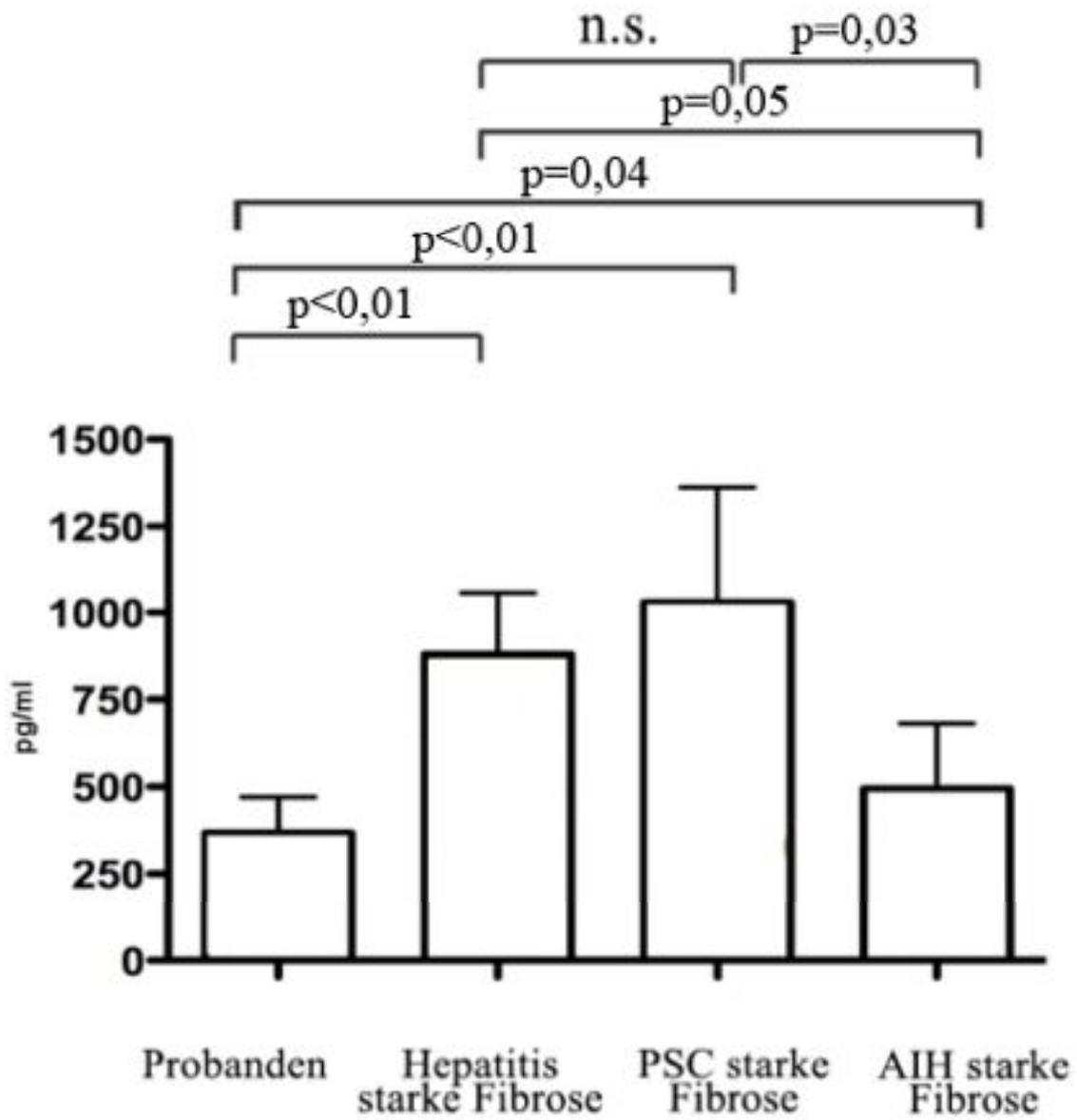


Abb. 28: Activin-Serumspiegel bei Patienten mit fortgeschrittener Fibrose

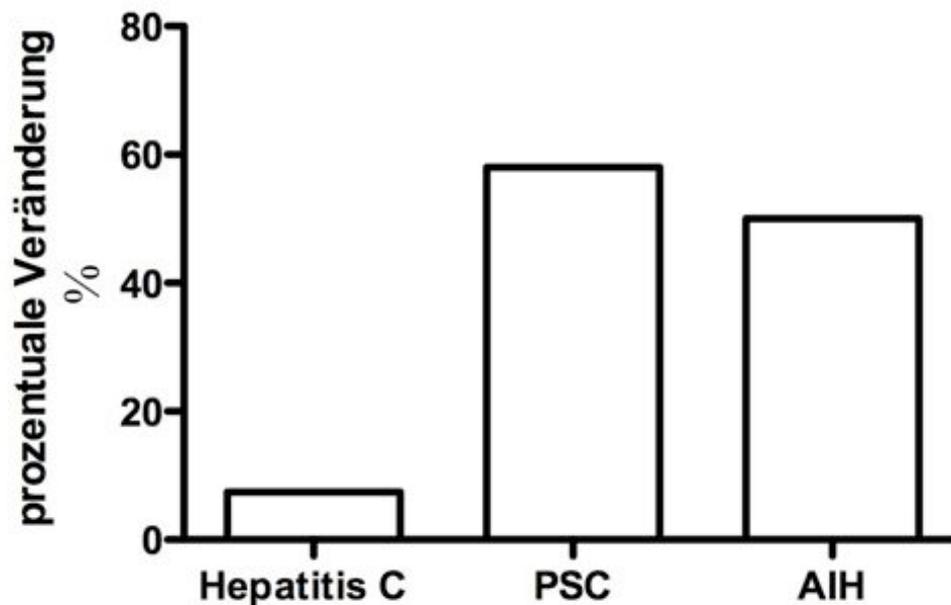


Abb. 29: Prozentuale Veränderung der Activinspiegel in Abhängigkeit von Fibrose bei Patienten mit Hepatitis C, PSC und AIH.

Für Activin konnte eine deutliche prozentuale Erhöhung in Abhängigkeit von Fibrose bei Patienten mit PSC (58%) und AIH (50%) festgestellt werden. Patienten mit chronischer Hepatitis C hatten zwar tendenziell auch einen Anstieg von Activin (7,44%), allerdings war dieser nicht so ausgeprägt wie bei Patienten mit AIH und PSC.

### 5.10.2 Follistatin-Serumspiegel bei Patienten mit PSC, AIH und chronischer Hepatitis C im Vergleich

Follistatin ist der physiologische Gegenspieler von Activin und könnte ebenfalls eine Rolle in der Regulierung der Fibrose spielen. Bei gesunden Probanden war der Serum-Follistatinspiegel (Median 985 pg/ml) signifikant niedriger als bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C (Median 1919,5 pg/ml,  $p < 0,001$ ), als bei PSC Patienten (Median 2415 pg/ml,  $p < 0,001$ ) und AIH Patienten (2144 pg/ml,  $p = 0,04$ ) mit leichter Fibrose der Leber. Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen PSC- und Hepatitis C-Patienten ( $p = 0,36$ ), oder PSC und AIH- Patienten ( $p = 0,25$ ) nachgewiesen. Auch zeigten sich keine Unterschiede zwischen Patienten mit einer chronischen Hepatitis C und Patienten mit einer AIH ( $p = 0,3$ )

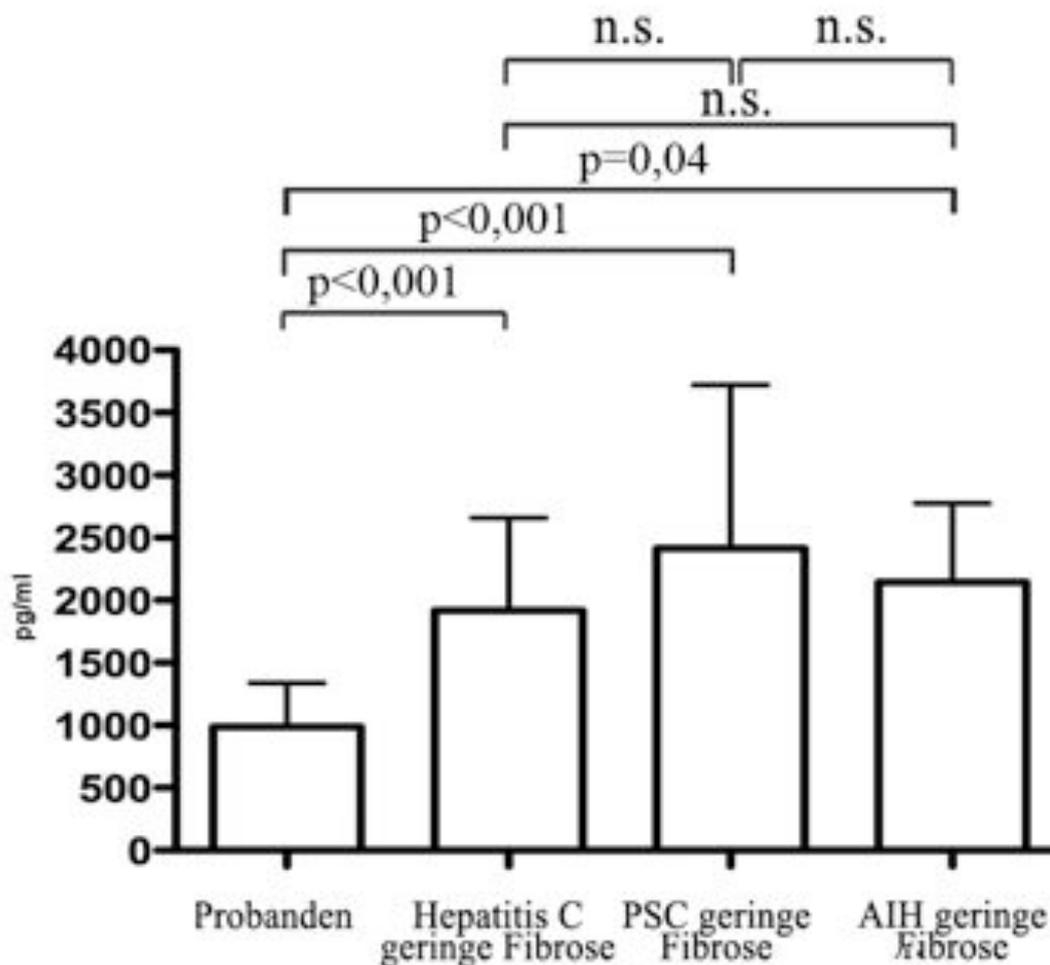


Abb. 30: Follistatin-Serumspiegel bei Patienten mit geringer Fibrose

Bei Patienten mit fortgeschrittener Leberfibrose fand sich gegenüber den gesunden Probanden (Median 985 pg/ml) bei PSC- (Median 1884 pg/ml,  $p=0,002$ ), AIH- (Median 2781 pg/ml,  $p<0,001$ ) und HCV-Patienten (Median 2547 pg/ml,  $p<0,001$ ), ein signifikant erhöhter Follistatinspiegel. Es bestand jedoch weder ein signifikanter Unterschied zwischen PSC und AIH-Patienten ( $p=0,19$ ) bzw. HCV-Patienten ( $p=0,25$ ), noch zwischen AIH Patienten und Hepatitis C Patienten ( $p=0,66$ ).

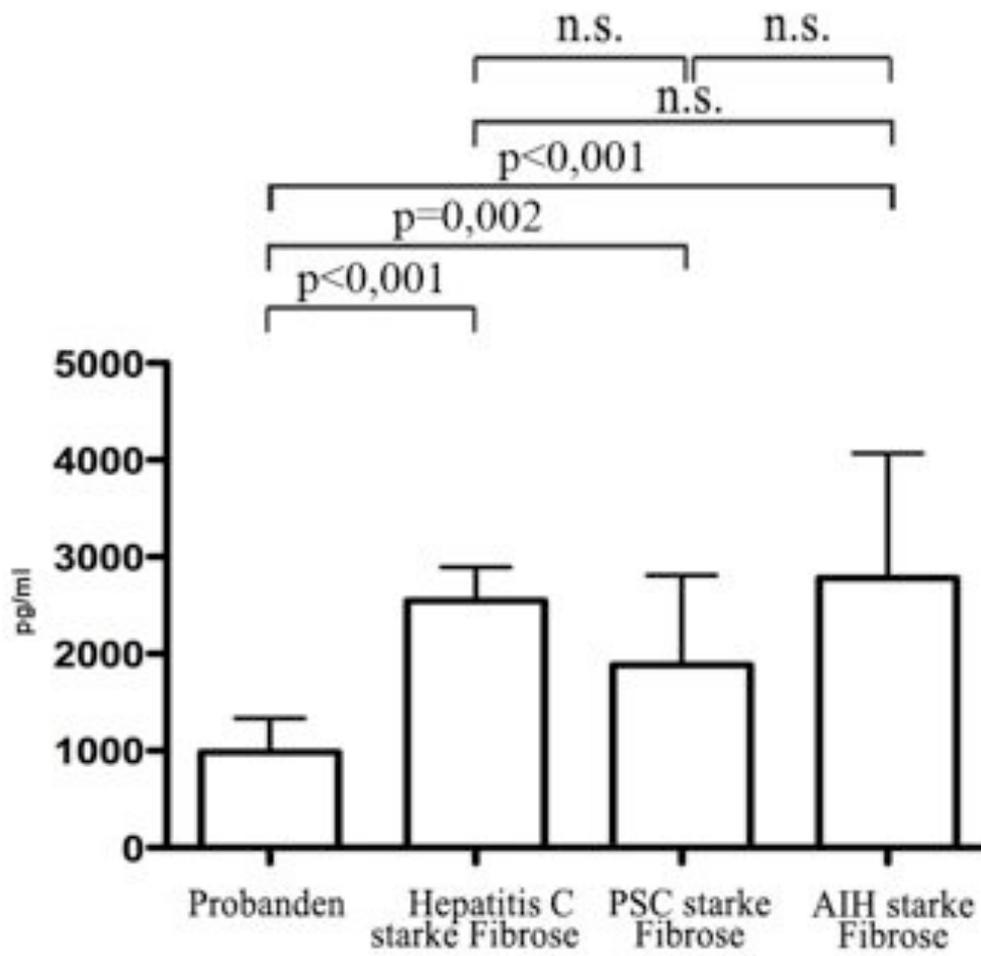


Abb. 31: Follistatin-Serumspiegel bei starker Fibrose

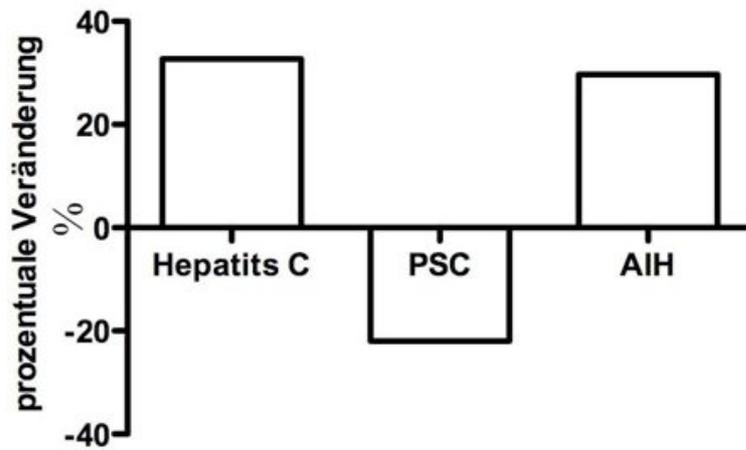


Abb. 34: Prozentuale Veränderung der Follistatin-Serumspiegel bei chronischer Hepatitis C, PSC und AIH in Abhängigkeit vom Fibrosegrad

Bei den Patientengruppen mit AIH und chronischer Hepatitis nahmen die Follistatin Serumspiegel um 29,7% bzw. 32,7% zu, während sie bei der PSC sogar abfielen (-22%).

### 5.10.3 Der Quotient Activin/Follistatin bei Patienten mit PSC, AIH und chronischer Hepatitis C im Vergleich

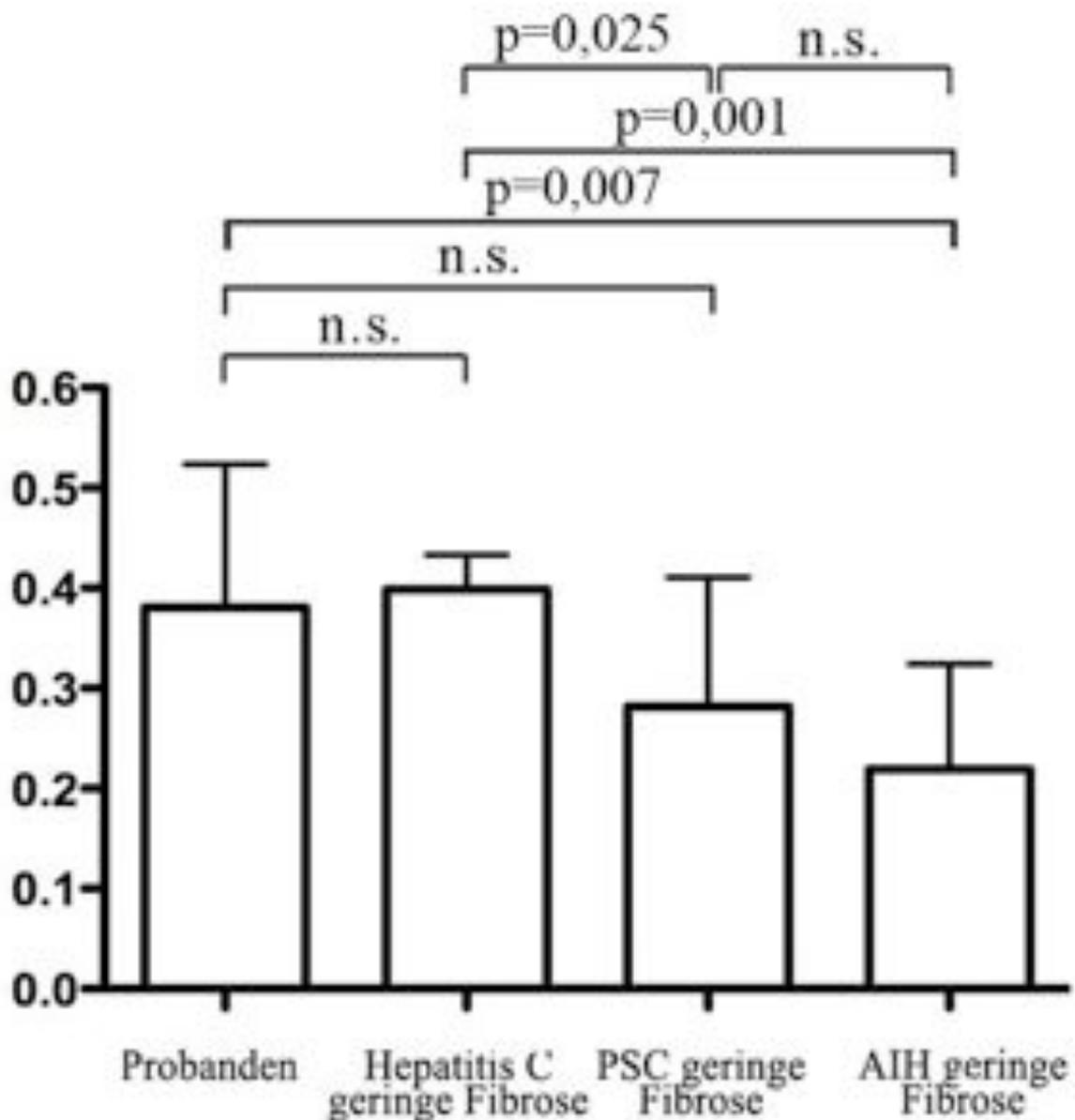


Abb. 32: Quotient aus Activin und Follistatin bei geringer Fibrose

Zur genaueren Untersuchung der Relationen von Activin und Follistatin wurde der Quotient von Activin und Follistatin gebildet. Es zeigte sich, dass er bei Patienten mit einer geringen Fibrose und chronischer Hepatitis C (Median 0,40,  $p=0,68$ ) und PSC (Median 0,28,  $p=0,16$ ) nicht signifikant von gesunden Patienten ohne Anzeichen von Fibrose (Median 0,38) abwich. Interessanterweise war der Quotient bei Patienten mit einer autoimmunen Hepatitis signifikant niedriger (Median 0,22,  $p=0,007$ ) als bei gesunden Probanden und Patienten mit einer chronischen Hepatitis C ( $p=0,001$ ). Auch Patienten mit einer PSC zeigten einen signifikant niedrigeren Quotienten als Patienten mit Hepatitis C ( $p=0,025$ ).

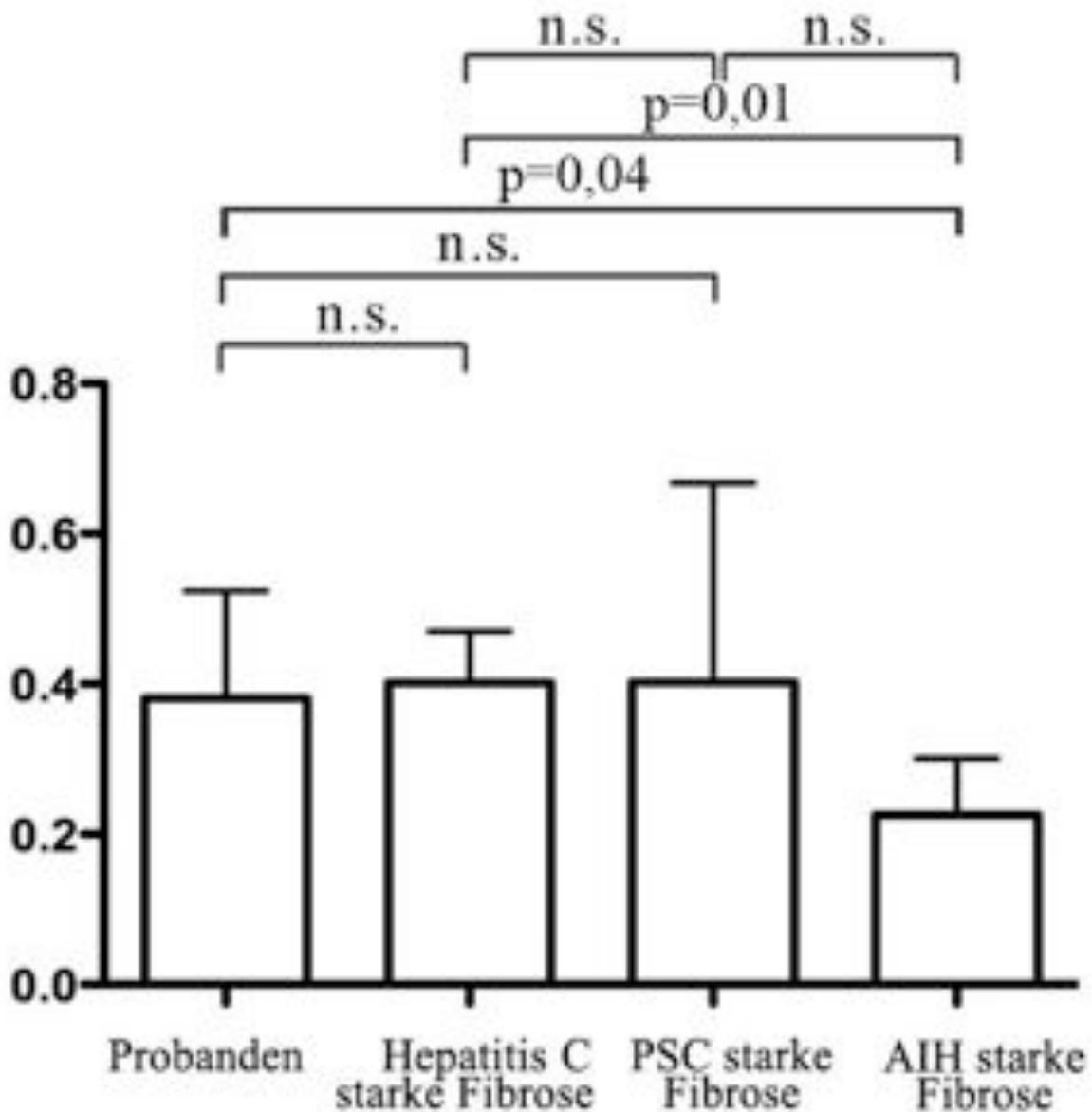


Abb. 33: Quotient aus Activin und Follistatin bei starker Fibrose

Bei deutlich ausgeprägter Fibrose zeigte sich, dass der Quotient aus Activin und Follistatin bei Patienten mit einer AIH (Median 0,23,  $p=0,04$ ) signifikant niedriger als bei gesunden Probanden liegt (Median 0,38). Der Quotient war nicht signifikant verschieden bei Patienten mit einer PSC (Median 0,40,  $p=0,65$ ) und chronischen Hepatitis C (Median 0,40,  $p=0,68$ ) im Vergleich zu gesunden Probanden. Es zeigte sich außerdem, dass, wie bei schwacher Fibrose, der Quotient bei der AIH-Gruppe niedriger als bei der Hepatitis C Gruppe war ( $p=0,01$ ). Der Unterschied zwischen der PSC- und der Hepatitis C-Gruppe war bei starker Fibrose nicht signifikant ( $p=0,84$ ).

#### 5.10.4 TGF- $\beta$ Serumspiegel bei Patienten mit PSC, AIH und chronischer Hepatitis C im Vergleich

TGF- $\beta$  ist eines der wichtigsten profibrogenen Zytokine. Wir haben daher den gesamt-TGF- $\beta$  Spiegel in den unterschiedlichen Patientengruppen untersucht. Der mediane TGF- $\beta$  Spiegel fand sich bei geringer Fibrose sowohl bei Patienten mit chronischer Hepatitis C (35470 pg/ml,  $p = 0,73$ ) und PSC (34219 pg/ml,  $p=0,68$ ), als auch bei der Gruppe mit AIH (33100 pg/ml,  $p=0,1$ ) unverändert im Vergleich zu gesunden Probanden (Median 32760 pg/ml). Auch wurde weder ein Unterschied zwischen der Patientengruppe mit Hepatitis C und der mit AIH ( $p=0,1$ ), oder PSC ( $p=0,63$ ), noch zwischen der Gruppe mit PSC und der mit AIH festgestellt ( $p=0,129$ ).

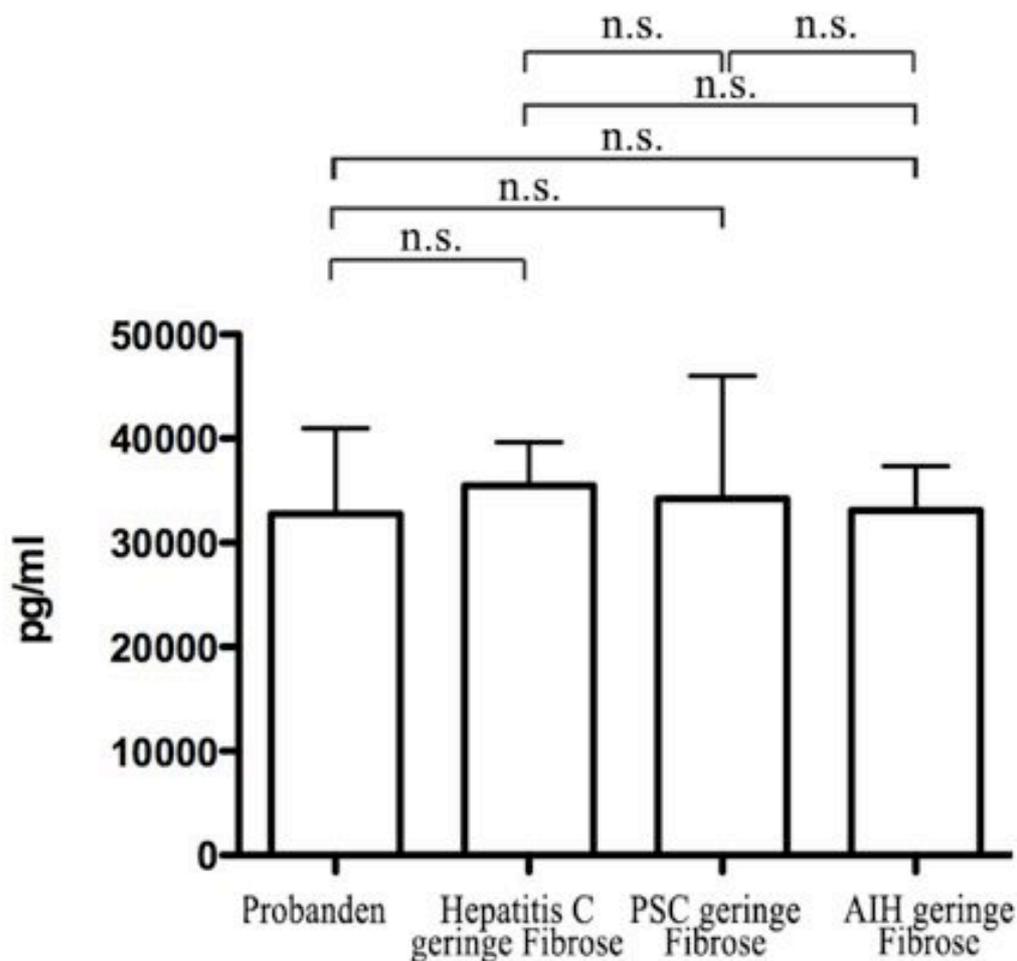


Abb. 35: TGF-beta-Serumspiegel bei geringer Fibrose

Auch bei Patienten mit fortgeschrittener Fibrose waren für Patienten mit PSC (Median 34660 pg/ml,  $p=0,6$ ) und chronischer Hepatitis C (Median 40610 pg/ml,  $p=0,24$ ) in den Seren keine signifikanten Unterschiede für die gesamt TGF $\beta$  Spiegel gegenüber der Gruppe der gesunden Probanden messbar. Bei Patienten mit einer AIH jedoch waren die TGF $\beta$  Spiegel gegenüber gesunden Probanden signifikant erhöht (Median 41180 pg/ml,  $p=0,01$ ). Weder die Gruppe der chronisch Hepatitis C Erkrankten ( $p=0,4$ ), noch die der PSC Erkrankten ( $p=0,5$ ) hatte signifikant verschiedene TGF- $\beta$ -Serumspiegel im Vergleich zu der AIH Gruppe. Es konnte auch keine Unterschiede bezüglich der Menge an gesamt TGF- $\beta$  bei der PSC und der Hepatitis C Gruppe nachgewiesen werden ( $p=0,36$ ).

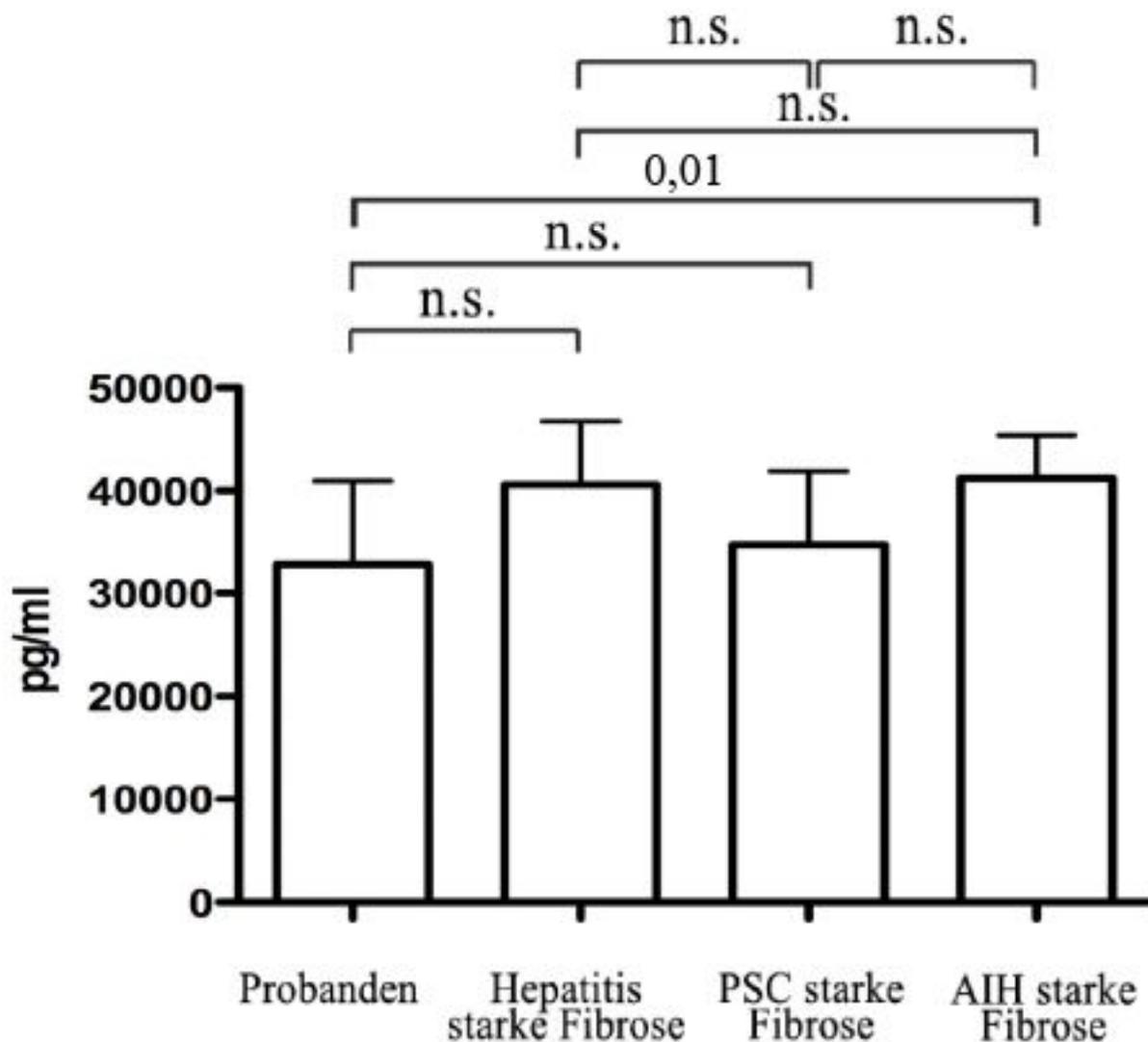


Abb. 36: Serum-TGF-beta-Spiegel bei stark ausgeprägter Fibrose

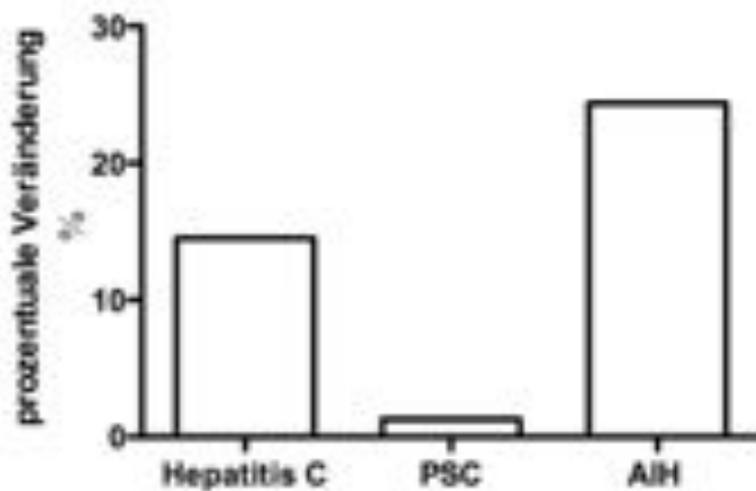


Abb. 37: Prozentualer Anstieg von TGF- $\beta$  bei Hepatitis C, PSC und AIH in Abhängigkeit von Fibrose

Sowohl bei der Patientengruppe mit chronischer Hepatitis C (14,5%), als auch bei der AIH Gruppe und der PSC Gruppe konnte ein Anstieg von TGF- $\beta$  im Serum festgestellt werden. Am ausgeprägtesten war der Anstieg bei den Patienten mit AIH (24,4%), während der Anstieg um 1,28% bei der PSC Gruppe dezent war.

### 5.11 Einfluss der Entzündungsaktivität auf Activin und Follistatin bei Patienten mit einer AIH

Ein weiteres Ziel der Versuche war es, die Serumspiegel von Activin  $\beta$ A, TGF $\beta$ 1 und Follistatin bei Patienten mit einer AIH in Abhängigkeit von der entzündlichen Aktivität zu vergleichen. Hierzu wurden die Seren zum Zeitpunkt einer starker biochemischer Aktivität herausgesucht und mit Seren derselben Probanden, die in Remission gewonnen wurden, verglichen. Als Surrogatmarker wurde die GPT herangezogen. Eine GPT über 100 U/l wurde als starke entzündliche Aktivität gewertet, während eine GPT unter 30 U/l als Remission gewertet wurde.

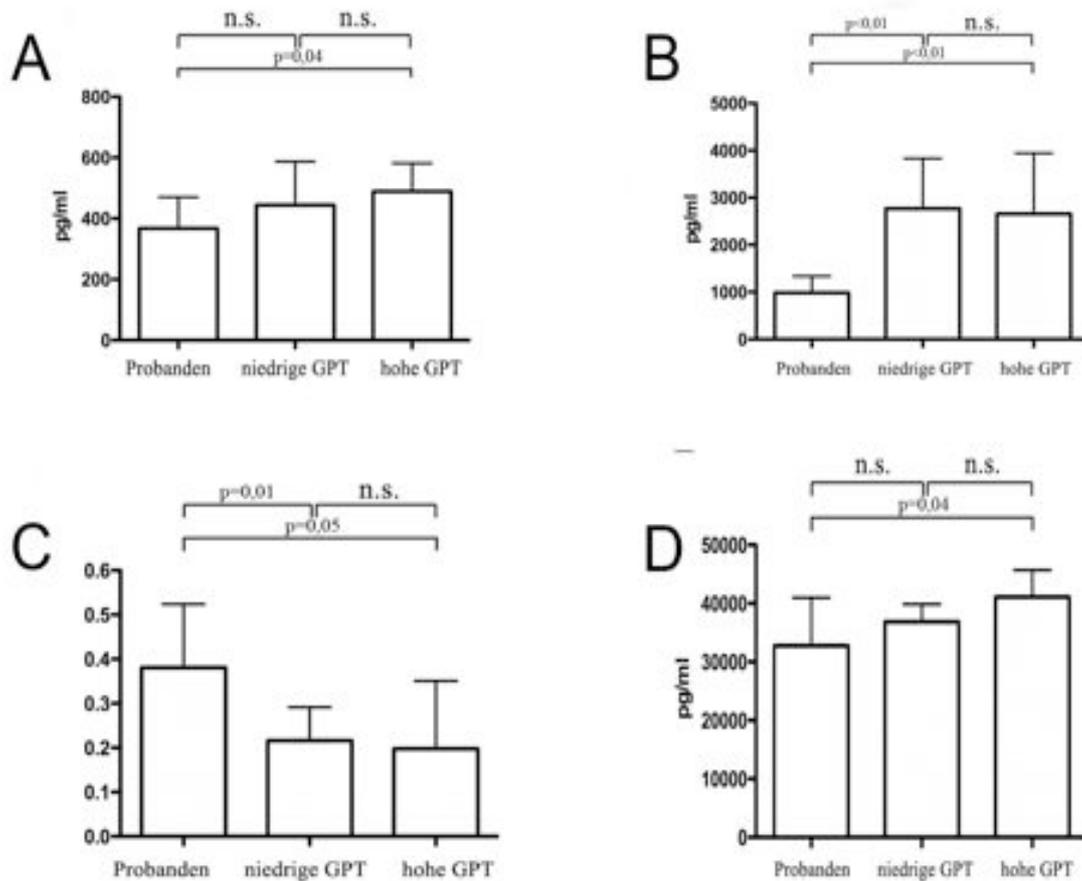


Abb. 38: A: Activin A Serumspiegel in Abhängigkeit der Entzündungsaktivität - B: Follistatin-Serumspiegel in Abhängigkeit der Entzündungsaktivität - C: Der Quotient von Activin und Follistatin in Abhängigkeit der entzündlichen Aktivität – D: TGF-beta-Serumspiegel in Abhängigkeit der entzündlichen Aktivität

### 5.11.1 Activin-Serumspiegel in Abhängigkeit der entzündlichen Aktivität bei Patienten mit AIH

Die Mediane der Patienten mit einer AIH in Remission (Median 447 pg/ml) und zum Zeitpunkt eines Schubes (Median 491 pg/ml) waren nicht signifikant verschieden ( $p=0,6$ ). Die Activinspiegel fanden sich allerdings im Schub im Vergleich zu gesunden Probanden (Median 367 pg/ml) signifikant erhöht ( $p=0,04$ ). Ein signifikanter Unterschied wurde in Remission gegenüber den gesunden Probanden nicht nachgewiesen ( $p=0,15$ ).

### 5.11.2 Follistatin in Abhängigkeit der entzündlichen Aktivität

Für die Follistatin-Serumspiegel fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten, die einen Schub der AIH hatten (Median 2657 pg/ml) und denen, deren Krankheit in Remission war (Median 2768 pg/ml,  $p=0,8$ ). Auch hier zeigte sich jedoch, dass analog zum Activinspiegel der Follistatinwert gegenüber Normalseren (Median 985 pg/ml) sowohl bei der Gruppe in Remission ( $p<0,001$ ), als auch im akuten Schub der Erkrankung ( $p<0,001$ ) signifikant erhöht waren.

Da Follistatin und Activin sich gegenseitig regulieren, errechneten wir den Quotienten aus Activin und Follistatin, um eine Verschiebung der Relation der sich gegenseitig antagonisierenden Proteine nachzuweisen. Hier wurde ein signifikant erniedrigter Quotient bei beiden Patientengruppen, in Remission (0,216;  $p=0,001$ ) und im Schub (0,2;  $p=0,005$ ) im Vergleich zu gesunden Probanden (0,381) nachgewiesen, wobei sich zwischen entzündlichem Schub der AIH und Remission kein signifikanter Unterschied zeigte ( $p=0,7$ ).

### 5.11.3 TGF- $\beta$ in Abhängigkeit der entzündlichen Aktivität bei Patienten mit einer AIH

TGF- $\beta$ -Serumspiegel fanden sich im Schub signifikant erhöht (Median 41090 pg/ml) im Vergleich zum gesunden Kollektiv (Median 21760 pg/ml,  $p<0,04$ ). Dieser Unterschied konnte bei Patienten mit einer geringen entzündlichen Aktivität (Median 36850 pg/ml) nicht nachgewiesen werden ( $p=0,48$ ). Auch konnte kein Unterschied bei AIH in Abhängigkeit der entzündlichen Aktivität nachgewiesen werden ( $p=0,07$ ), (Abb.38).

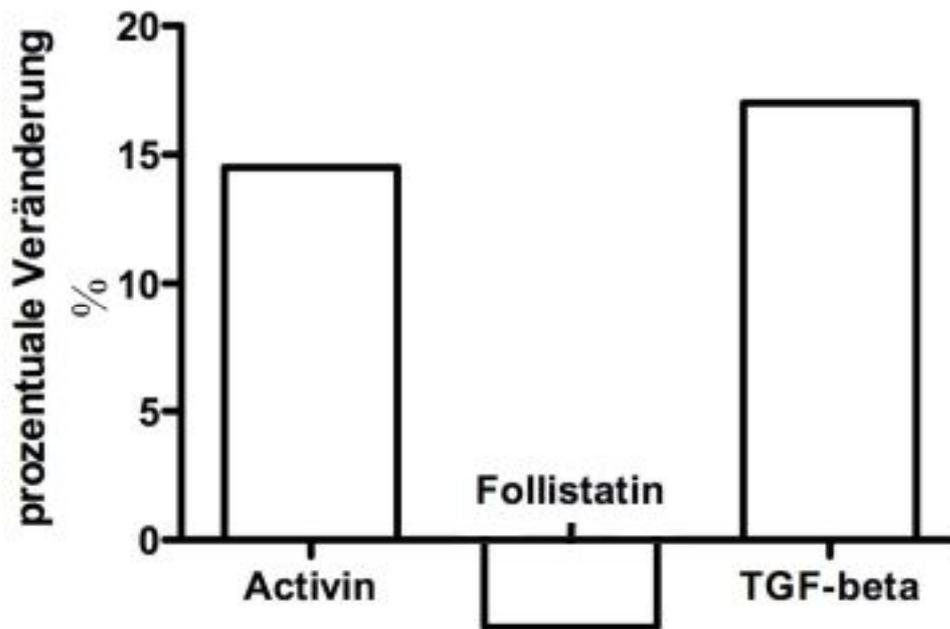


Abb. 42: Prozentuale Veränderung von Activin, Follistatin und TGF- $\beta$  in Patientenseren bei AIH, bei hoher entzündlicher Aktivität gegenüber geringer entzündlicher Aktivität.

Activin  $\beta$ A und TGF- $\beta$  konnten im Serum in Abhängigkeit von Entzündung erhöht nachgewiesen werden (14,5% bzw. 17%). Die Konzentration für Follistatin sank tendentiell (-3,4%).

## 5.12 Histologische Analyse der Expression von Activin

### Histologie von Patienten mit Primär Sklerosierender Cholangitis

Um die Expression von Activin in der Leber von Patienten mit PSC zu untersuchen, wurden Paraffinschnitte von Leberbiopsien angefertigt und eine Immunfärbung gegen Activin durchgeführt. Die Zellkerne wurden zu besserer Orientierung mit einem fluoreszierenden Farbstoff blau angefärbt. Die immunhistochemische Färbung wurde nach den Antikörperreaktionen mit dem TSA-Kit verstärkt. Diese Reaktion verstärkt den Kontrast der immunhistologischen Färbung.

Als Kontrollen wurde eine Isotypkontrolle benutzt, welche die unspezifische Hintergrundfärbung nachweist. Hierfür wurde als Erstantikörper ein unspezifisch bindender

IgG2 Antikörper benutzt. Die Bindung des IgG2 Antikörpers war sehr gering und führte kaum zu sichtbarer Färbung des Gewebes. Eine starke Bindung des Zweitantikörpers kann somit ausgeschlossen werden.

Zum Vergleich wurde normales Lebergewebe von zwei Patienten als Kontrolle gegen Activin gefärbt. Normales Lebergewebe zeigte eine gleichmäßige Expression des Activins, vor allem im Bereich der Hepatozyten konnte eine Expression des Activins nachgewiesen werden. Im Bereich der Gallengänge kam es zu keiner Expression von Activin.

Des Weiteren wurden drei histologische Paraffinschnitte von alkoholtoxischen Leberzirrhosen gefärbt. Diese Schnitte wurden einerseits als positive Kontrolle benutzt, andererseits um Veränderungen in der Verteilung des Activins bei der PSC nachweisen. Bei Patienten mit ethyltoxischer Zirrhose zeigte sich ein ähnliches Verteilungsmuster. Die Areale mit starker Fibrose zeigten keine verstärkte Activin Expression, es konnte keine Umverteilung des Activins festgestellt werden.

Insgesamt wurden 9 Patienten mit PSC und schwacher Fibrose untersucht und 10 Patienten mit starker Fibrose. Der Vergleich mit gesundem Lebergewebe und mit der ethyltoxischen Leberzirrhose zeigte keinen deutlichen Unterschied in der Proteinexpression.

Activin wurde, wie auch in gesundem Lebergewebe, vor allem in den Hepatozyten exprimiert. Es konnte auch in Abhängigkeit des Schweregrades der Fibrose keine Umverteilung der Activinexpression nachgewiesen werden. In den Paraffinschnitten lässt sich die Färbung von Activin deutlich nachvollziehen. Auch hier zeigt sich eine Expression von Activin in den Hepatozyten. Im Bereich um die Gallengänge war allenfalls eine dezente Akzentuierung der Activinexpression festzustellen. Ein Unterschied in der Verteilung bei Patienten mit PSC konnte folglich nicht nachvollzogen werden.

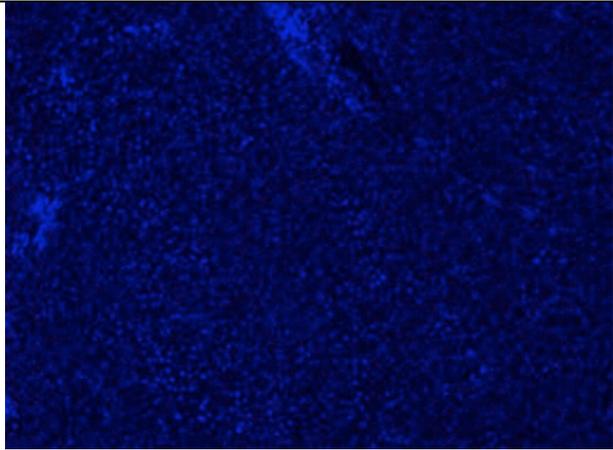


Abb.43: Negativ Kontrolle mit IgG2 Isotyp 1. Antikörper (Vergrößerung 50-fach)

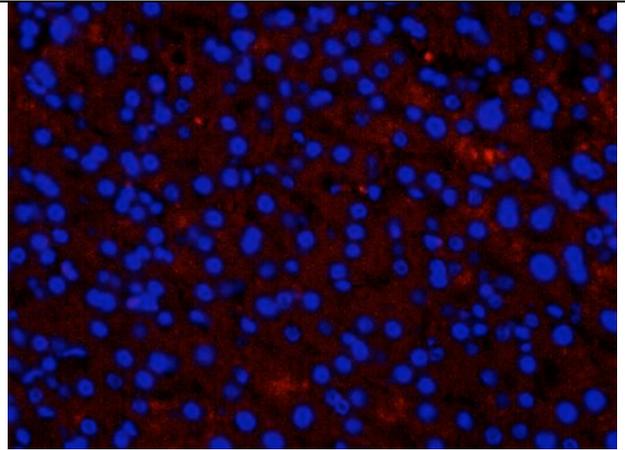


Abb. 44: Negativ Kontrolle (Vergrößerung 100-fach)

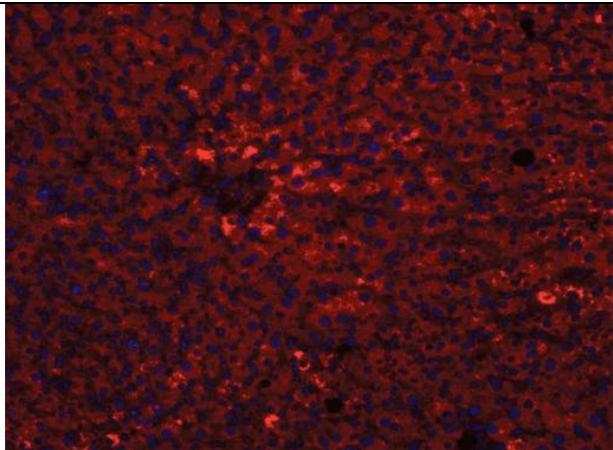


Abb. 45: normale Leber in 50-facher Vergrößerung

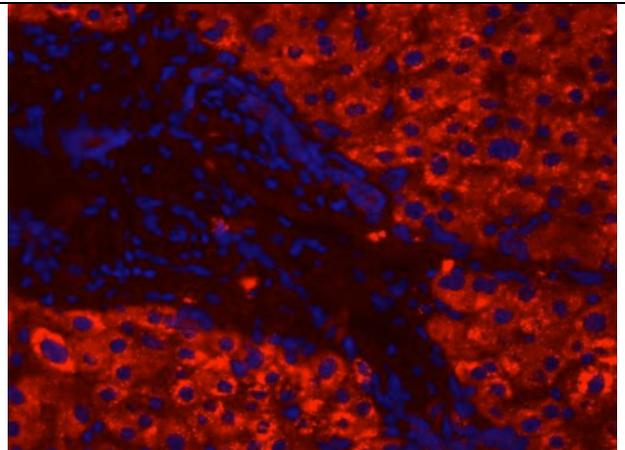


Abb. 46: normale Leber in 100-facher Vergrößerung

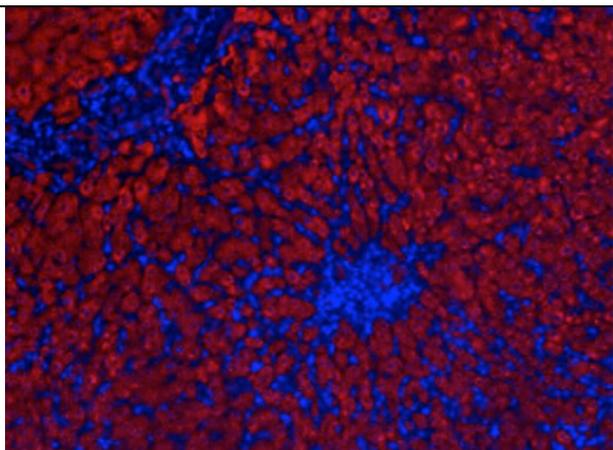


Abb. 47: ethyltoxische Leberzirrhose in 50-facher Vergrößerung

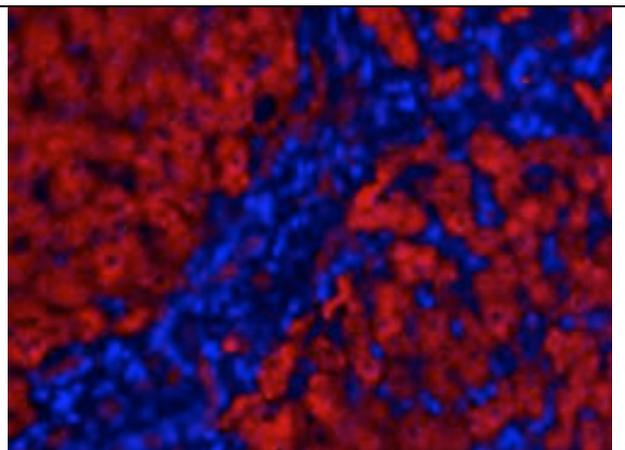


Abb. 48: ethyltoxische Leberzirrhose in 100-facher Vergrößerung

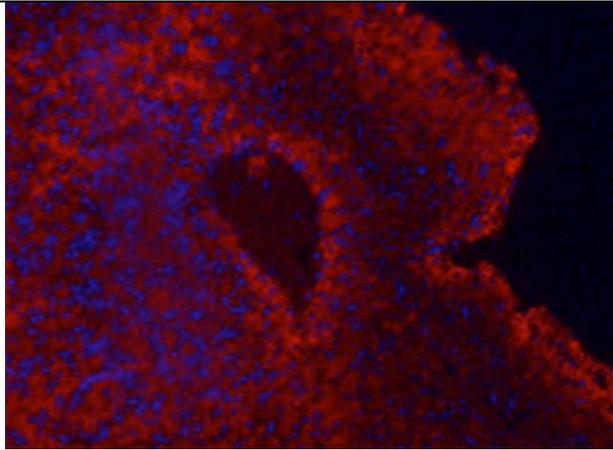


Abb. 49: Gruppe 1, 50-fache Vergrößerung

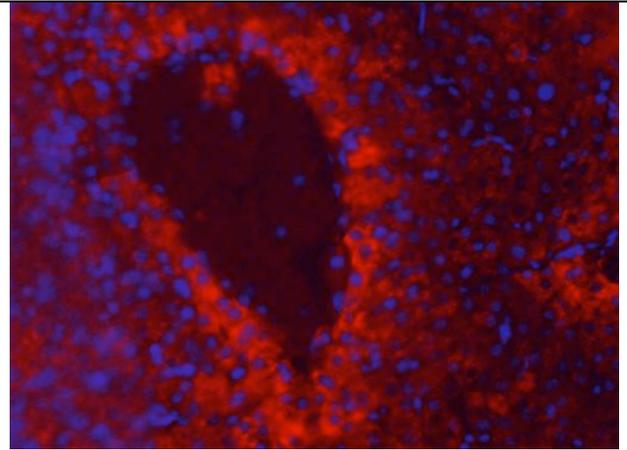


Abb. 50: Gruppe 1, 100-fache Vergrößerung

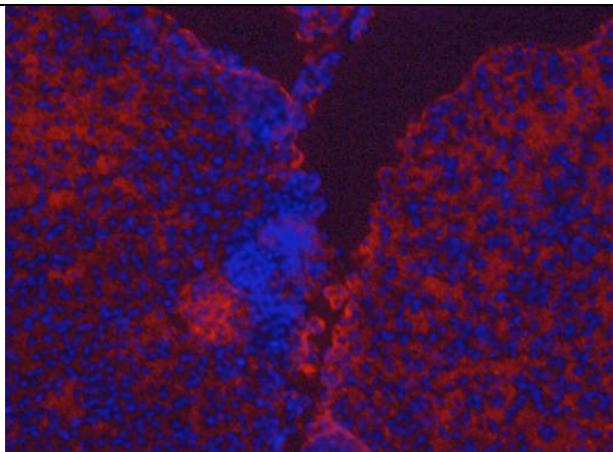


Abb. 51: Gruppe 1, 50-fache Vergrößerung

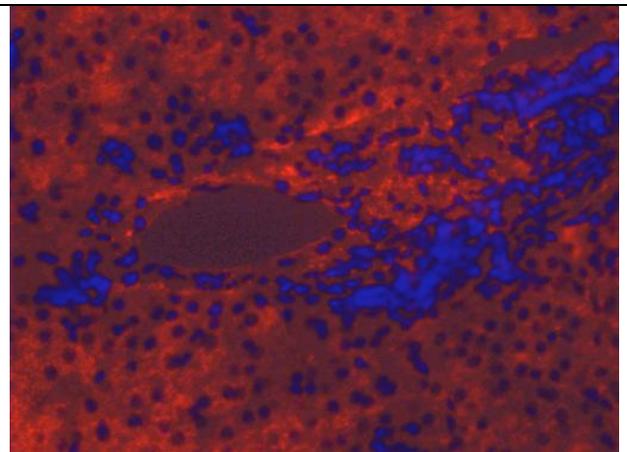


Abb. 52: Gruppe 1 100-fache Vergrößerung

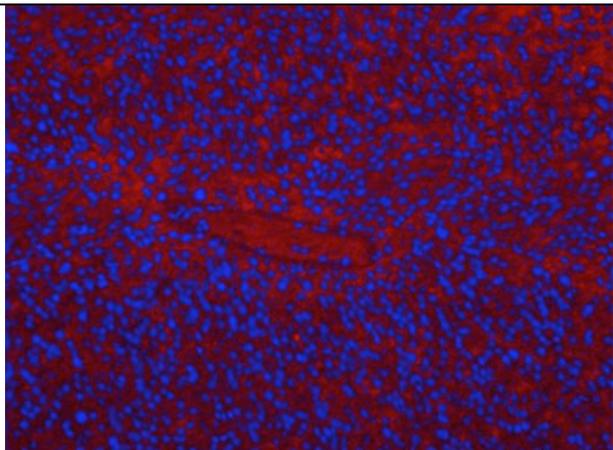


Abb. 53: Gruppe 1, 50-fache Vergrößerung

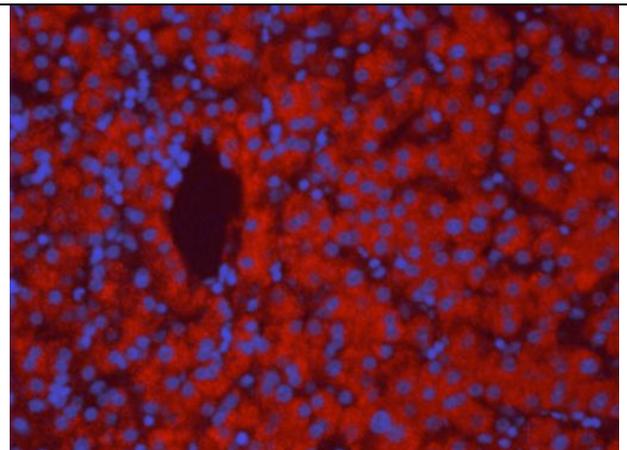


Abb. 54: Gruppe 1, 100-fache Vergrößerung

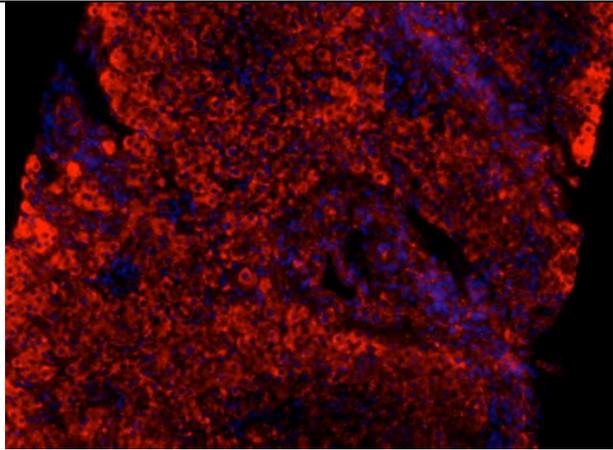


Abb. 55: Gruppe 2, 50-fache Vergrößerung

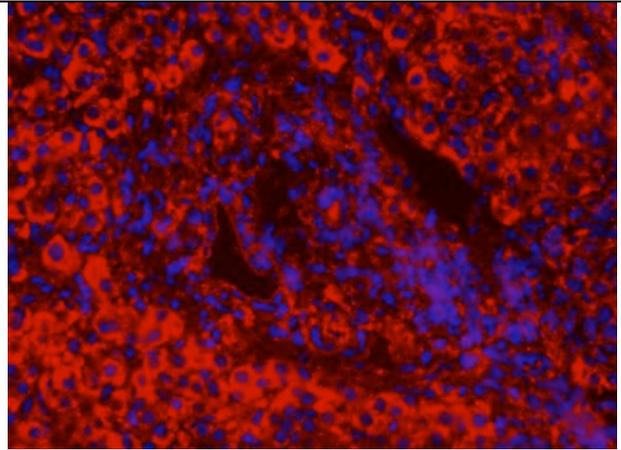


Abb. 56: Gruppe 2, 100-fache Vergrößerung

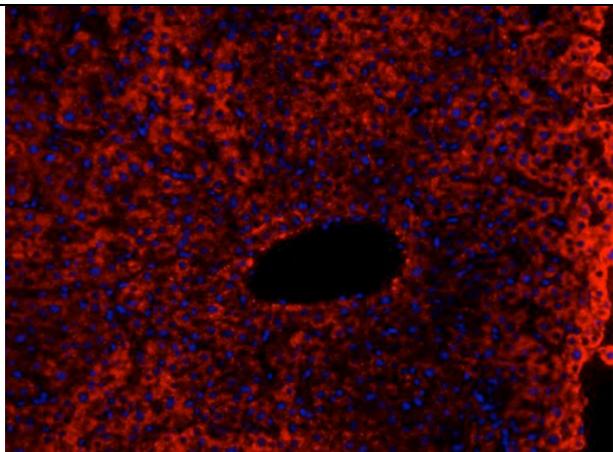


Abb. 57: Gruppe 2, 50-fache Vergrößerung

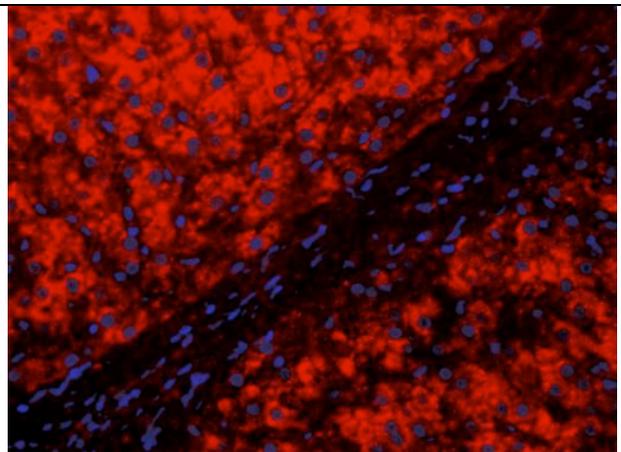


Abb. 58: Gruppe 2, 100-fache Vergrößerung

Abb.43: Negativkontrolle - gesundes Lebergewebe gefärbt mit unspezifischem IgG2 Isotyp 1 Antikörper (50-fach vergrößert). Abb. 44: gesundes Lebergewebe gefärbt mit unspezifischem IgG2 Isotyp 1 Antikörper (100-fache Vergrößerung); Abb. 45-46: gesundes Lebergewebe gefärbt mit anti-Activin Antikörper Abb. 47-48: ethyltoxische Leberzirrhose gefärbt mit Activin Antikörper; Abb. 49-54: PSC mit geringgradiger Fibrose. Abb. 55-58: PSC mit höhergradiger Fibrose

## 6. Diskussion

### 6.1 Die Bedeutung von Activin, Follistatin und TGF- $\beta$ für die Fibrogenese und Entzündung

Die Leber ist das wichtigste Organ des Stoffwechsels, das sich ständig wechselnden Bedingungen anpassen muss. Folglich ist es wichtig, dass das Volumen der Leber einem gut funktionierenden Regelkreis unterworfen ist. Die Familie der TGF- $\beta$  Zytokine spielt bei vielen Vorgängen im Körper eine steuernde Rolle. Vor allem bei Entzündungs- und Wachstumsvorgängen scheinen diese Zytokine von großer Bedeutung zu sein (Hanada and Yoshimura 2002). Das Gleichgewicht von Activin und Follistatin ist bei der Regulierung der Leberregeneration von entscheidender Bedeutung. Activin A ist ein negativer Faktor in der Leberanpassung, der das Hepatozytenwachstum hemmt. Follistatin hingegen führt zu einer Hyperproliferation der Hepatozyten, was jedoch nicht mit einer gesteigerten Leberfunktion einhergeht. Dies zeigt, dass sowohl die positive, wie auch die negative Kontrolle der Leberregeneration für eine optimale Funktion des Gewebes entscheidend sind (Takabe, Wang et al. 2003). TGF- $\beta$ 1 ist ebenfalls bei Entzündungen der Leber erhöht, wahrscheinlich spielt TGF- $\beta$ 1 ebenfalls eine entscheidende Rolle bei Entzündungsmediation und Regeneration der Leber (Breitkopf, Godoy et al. 2006). Auf der anderen Seite geht Entzündung und Heilung mit Narbenbildung einher, diese Vorgänge verlaufen zeitlich überlappend. Daher spielen diese Faktoren in der Fibrogenese ebenfalls eine bedeutende Rolle und es fällt schwierig Entzündung und Fibrogenese voneinander abzugrenzen.

In dieser Arbeit wurden die Veränderungen von Activin-, Follistatin- und gesamt TGF- $\beta$ 1-Spiegeln bei Leberfibrose und -entzündung im Serum von Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen untersucht. Zytokine der TGF- $\beta$  Familie spielen eine wesentliche Rolle in der Zellsteuerung und der Anpassung der Zelle an veränderte Umwelteinflüsse. Das Endstadium chronischer Lebererkrankungen ist die Leberzirrhose. Deshalb ist die Erforschung der pathophysiologischen Zusammenhänge der Leberfibrose und der möglichen Therapieansätze von großem medizinischen Interesse. Hier könnten in Zukunft Therapien entwickelt werden, die darauf abzielen, den Progress hin zur Leberzirrhose zu verlangsamen oder sogar zu verhindern.

Die Zusammenhänge von Activin A und Follistatin bei autoimmunen Lebererkrankungen ist bislang noch nicht nähergehend erforscht worden.

### 6.1.1 Activin A, Follistatin und TGF- $\beta$ 1 und Fibrose

Activin A wurde bereits mit verschiedenen Lebererkrankungen in Verbindung gebracht. So wird eine regulierende Rolle bei der Pathogenese des akuten Leberversagens, der chronisch viralen Hepatitis, alkoholtoxischen Zirrhose, der NASH und der Entwicklung hepatischer Tumoren vermutet (Patella, Phillips et al. 2001; Yuen, Norris et al. 2002; Rodgarkia-Dara, Vejda et al. 2006).

In dieser Arbeit wurden Activin A-Serumspiegel bei Patienten, die an einer PSC und Patienten, die an einer AIH erkrankt waren, miteinander verglichen. Ziel der Arbeit war es herauszufinden, ob bei zunehmender Fibrose eine Veränderung der Activin A- oder Follistatin Konzentration im Serum auftritt.

Es konnte gezeigt werden, dass es sowohl bei Patienten mit einer AIH, als auch bei Patienten mit einer PSC bei zunehmender Fibrose zu einer signifikanten Erhöhung der Activin A-Serumspiegel kommt. Bei Patienten, die an einer Hepatitis C erkrankt waren, war kein signifikanter Anstieg in Abhängigkeit der fibrotischen Veränderung der Leber nachweisbar.

Zur näheren Untersuchung wurden die Seren mit denen von gesunden Probanden verglichen. Hier zeigte sich, dass sowohl bei Hepatitis C, als auch PSC und AIH Patienten ein signifikant erhöhter Activin-A-Spiegel bei starker Fibrose nachweisbar war. Im Vergleich mit gesunden Probanden und Patienten mit geringen fibrotischen Veränderungen war dieser Unterschied bei Hepatitis C und bei PSC Patienten nachweisbar. Patienten mit einer AIH und geringen fibrotischen Veränderungen zeigten keinen signifikant erhöhten Activin-Serumspiegel.

Außerdem wurden die Seren auf den funktionellen Antagonisten Follistatin untersucht. Hier zeigte sich keine signifikante Erhöhung in Abhängigkeit des Fibrosegrades.

Verglichen mit gesunden Probanden zeigte sich jedoch sowohl bei geringen, als auch bei starken fibrotischen Veränderungen ein erhöhter Follistatinspiegel bei Hepatitis C, AIH und PSC Patienten.

Weder bei geringer Fibrose noch bei starker Fibrose zeigten sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Patientengruppen hinsichtlich des Follistatinspiegels.

Zur genaueren Untersuchung des Gleichgewichtes von Activin A und Follistatin wurde der Quotient von Follistatin und Activin A gebildet. Hier konnte eine Verschiebung in Richtung des Activin A's in Abhängigkeit der Fibrose nachgewiesen werden.

Der Quotient aus Activin A und Follistatin zeigte bei Patienten mit einer PSC mit geringer und mit starker Fibrose eine signifikante Verschiebung des Verhältnisses hin zu dem profibrinogenen Activin A. Bei Patienten mit einer AIH konnte dieser Unterschied in Abhängigkeit der Fibrose nicht nachgewiesen werden.

Die Pathogenese der AIH und PSC ist nicht hinreichend geklärt, aber Schädigung der Hepatozyten, Entzündung und Fibrose sind wesentliche pathogene Faktoren der Erkrankungen. Activin und Follistatin sind, neben anderen Zytokinen, wesentliche Modulatoren von Entzündung und Fibrose und spielen wahrscheinlich deshalb in der Progression der Erkrankungen eine wichtige Rolle.

Bei verschiedenen fibrotischen Erkrankungen wurde ein erhöhter Activin-A-Serumspiegel nachgewiesen, wie z.B. bei Nierenfibrose (Yamashita, Maeshima et al. 2004), Lungenfibrose (Matsuse, Fukuchi et al. 1995) oder bei Pankreasfibrose (Ohnishi, Miyata et al. 2003).

Bei Patienten mit einer NASH konnte ebenfalls ein erhöhter Activin-A-Spiegel und ein erhöhter Follistatinspiegel nachgewiesen werden, welcher ebenfalls mit dem Grad an Fibrose korrelierte (Yndestad, Haukeland et al. 2009). Unsere Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Yndestad.

Auch in Patienten mit einer alkoholtoxischen Leberzirrhose waren Follistatin-Spiegel und Activin-Spiegel erhöht (Yuen, Norris et al. 2002). Der Activin-A-Serumspiegel korrelierte mit dem Child-Pugh Score. Die Seren wurden jedoch nicht mit dem Grad der Fibrose verglichen.

Bei Hepatitis B und Hepatitis C Patienten zeigte sich keine signifikante Erhöhung der Activin A-Serumspiegel und auch der Follistatin-Serumspiegel in Korrelation mit dem Grad der Fibrose, jedoch wurde bereits von Patella vermutet, dass dies an der Auswahl der Biopsien lag, welche mehrheitlich geringe Fibrosegrade aufwiesen (Patella, Phillips et al. 2001).

Activin-A-Serumspiegel variieren im Laufe des Lebens und sind bei Männern und Frauen unterschiedlich (Loria, Petraglia et al. 1998). In dieser Untersuchung wurde die Kontrollgruppe bezüglich der Altersverteilung und der Geschlechtsverteilung angeglichen. Bei autoimmunen Hepatitiden könnte ein Grund für den nicht erhöhten Activin-A-Spiegel bei geringer Fibrose gegenüber gesunden Probanden in der Pathophysiologie der Erkrankung selbst liegen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der Grund für den niedrigeren Activin Serumspiegel in der Auswahl der Patienten lag, deren histologische Klassifikation in der Gruppe mit geringen fibrotischen Veränderungen mehrheitlich in Stadium 0-1 nach Ludwig lag.

Zudem wurde die Verteilung von Activin in der Leber in Abhängigkeit des Fibrosegrades histologisch untersucht. Hierzu wurden Leberbiopsien von PSC Patienten mit einer weniger stark ausgeprägten Fibrose und einer fortgeschrittenen Leberfibrose untersucht, um einen möglichen Unterschied in der Verteilung des Activins zu untersuchen. Diese Histologien wurden schließlich mit denen von alkoholtoxischen Fibrosen und gesundem Lebergewebe verglichen. Ziel war es, einen Unterschied im Verteilungsmuster des Activin A's in Abhängigkeit des Fibrorestadiums und der Erkrankung festzustellen. Bei der PSC handelt es sich um eine fokale Entzündung des Lebergewebes und insbesondere der Gallengänge, folglich erwarteten wir eine, dass in den Gebieten um die Gallengänge eine verstärkte Expression des Activin A's stattfindet.

Es stellte sich beim Vergleich der immunohistochemischen Färbungen bei Patienten mit PSC mit geringen entzündlichen Veränderungen und der Proben von Patienten mit starken entzündlichen Veränderungen kein Unterschied im Verteilungsmuster dar.

Die Daten zu den histologischen Färbungen von Activin A in der Leber sind insgesamt uneinheitlich. De Bleser et al. konnte eine gleichmässige Verteilung von Activin A in den Hepatozyten gesunder Lebern beobachten (De Bleser, Niki et al. 1997), Sugiyama konnte hingegen kein Activin in Hepatozyten nachweisen (Sugiyama, Ichida et al. 1998). Auch Huang konnte keine verstärkte Expression von Activin in Hepatozyten bei experimentell provozierte Leberfibrose in Ratten nachweisen (Huang, Li et al. 2001). Die Arbeiten von Patella zeigten bei Hepatitis B und C Patienten eine Expression von Activin und Follistatin in Hepatozyten. Eine Umverteilung in apoptotische Hepatozyten in fibrotischen Areale konnte jedoch nur auf mRNA Ebene nachgewiesen werden (Patella, Phillips et al. 2001). Von der mRNA Menge kann jedoch nicht auf die Proteinmenge in den Hepatozyten rückgeschlossen werden. Das Protein Activin ist wesentlich stabiler ist, als die mRNA (Gold, Francis et al. 2003).

Wir konnten Activin A in Hepatozyten nachweisen, die Unterschiede zu Sugiyama können durch die sensitivere Färbemethode mittels TSA verursacht worden sein.

In unseren Untersuchungen ist jedoch auch nicht auszuschliessen, dass die starke Kontrasterhöhung durch das TSA-Kit mitverantwortlich dafür ist, dass bei sehr geringen Veränderungen in der Genexpression Unterschiede in der Activin-A-Expression nicht mehr zu erkennen sind.

Weiterführende Arbeiten bezüglich dem Nachweis von Follistatin, Färbungen von apoptotischen Zellen und der Nachweis von mRNA in histologischen Schnitten von Lebern mit AIH und PSC könnten weitere Hinweise auf die Rolle von Activin A in diesem Krankheitsbild geben.

Leberfibrose ist charakterisiert durch übermäßige Ablagerung von Komponenten der extrazellulären Matrix nach Aktivierung von Ito-Zellen und Transformation in Myofibroblasten, welche Kollagen produzieren (Alcolado, Arthur et al. 1997; Reeves and Friedman 2002).

Activin A inhibiert das Hepatozytenwachstum, indem es DNA-Synthese hemmt und somit die Mitosehäufigkeit der Hepatozyten verringert, und auch indem es Apoptose induziert (Schwall, Robbins et al. 1993). Gesteigerte Apoptose führt im Verlauf zu einer Leberfibrose (Canbay, Friedman et al. 2004).

Desweiteren ist Activin A profibrinogen, indem es die Produktion extrazellulärer Matrix induziert (Patella, Phillips et al. 2006). Activin fördert die Bildung von Kollagen III und induziert die Expression von Matrix-Metallo-Proteinase und TGF- $\beta$  (Yndestad, Haukeland et al. 2009). Die Bildung von Fibronectin, einem Glykoprotein der extrazellulären Matrix, wird in Ito-Zellen ebenfalls durch Activin induziert (Date, Matsuzaki et al. 2000). Dies demonstriert die steuernde Rolle von Activin A in der Fibrogenese. Die Mechanismen über die Activin A zur Leberfibrose führt sind teilweise aufgeklärt. Hier spielen Proteine wie p53, p21 und CDK4 eine Rolle (Zauberman, Oren et al. 1997). Das Apoptosesignal wird über den Kinase Inhibitor p15 und das Protein Sp1 vermittelt (Ho, de Guise et al. 2004).

Bei experimentell induzierter Leberzirrhose in Ratten konnte eine verstärkte Expression von Activin A festgestellt werden. Man folgerte, dass das Gleichgewicht zwischen Activin A und Follistatin zu Gunsten des Activins verschoben ist. Dies könnte ein Mechanismus sein, der schließlich zur Leberfibrose führt (Huang, Li et al. 2001). Da Activin A und Follistatin Zytokine sind, welche im Körper ubiquitär vorkommen, ist es schwierig von der Serumkonzentration einen Rückschluss auf die Konzentration im erkrankten Lebergewebe zu ziehen. Dies macht die Interpretation unserer Ergebnisse schwierig. Es erscheint sinnvoll, dass bei fibrotischen Erkrankungen eines Organes der Serumfollistatinspiegel erhöht ist, um die Wirkung von Activin A ausserhalb des erkrankten Gewebes zu neutralisieren.

Messungen von TGF- $\beta$ 1 bei Patienten im Serum, portalvenösen und lebervenenösen Blut ergaben, dass die Konzentration von Activin im lebervenenösen Blut am höchsten war bei Patienten mit alkoholtoxischer Zirrhose. Interessant wäre es, die Konzentration von Activin und Follistatin im Vergleich zu messen (Wanninger, Wiest et al. 2011).

Die Ermittlung des Fibrosegrades ist für den Therapieverlauf bei einer AIH und für die Einschätzung des Krankheitsverlaufes bei einer PSC von Bedeutung. Aktuell ist die Leberbiopsie der Goldstandard unter den Diagnostikmethoden. Allerdings sind auch die Ergebnisse der Leberbiopsie nicht immer verlässlich, da nur ein geringer Teil des Lebergewebes untersucht wird. Zudem birgt die Punktion von Lebergewebe Risiken. Dies führt dazu, dass einige Patienten, diese Diagnostik nicht wünschen. Serologische Marker zur

Unterstützung der Diagnostik und Alternativen zur Leberbiopsie zu entwickeln sind von Interesse. Activin A könnte hier ein serologischer Marker zur Einschätzung des Fibrosegrades sein.

TGF- $\beta$ 1 wurde bereits mit einer Reihe von fibrotischen Erkrankungen in Verbindung begrachtet (Noble, Harper et al. 1992; Clouthier, Comerford et al. 1997; Sato, Muragaki et al. 2003). Für aktives TGF- $\beta$ 1 ist bereits beschrieben, dass es eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Leberzirrhose spielt (Dooley, Delvoux et al. 2000). TGF- $\beta$ 1 wurde bei unterschiedlichen Lebererkrankungen untersucht, es zeigte sich eine Erhöhung bei alkoholinduzierter Zirrhose und bei hepatocellulären Carcinomen. Hier wurde jedoch nicht das gesamt TGF- $\beta$ 1, sondern das aktive TGF- $\beta$ 1 untersucht (Shirai, Kawata et al. 1994). In dieser Arbeit sollte der gesamt TGF- $\beta$ 1 Spiegel bei AIH und PSC in Abhängigkeit der Fibrose untersucht werden.

Der Serumspiegel für gesamt TGF- $\beta$ 1 war bei PSC Patienten und AIH Patienten war nicht erhöht bei geringer und starker Fibrose. Auch im Vergleich von PSC, AIH und Hepatitis C untereinander konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Gesamt TGF- $\beta$ 1 Spiegel sind bislang selten publiziert. Deswegen war es interessant den Einfluss von gesamt TGF- $\beta$ 1 auf die Fibrose zu untersuchen.

Bei Patienten mit einer Steatohepatitis konnte kein erhöhten TGF- $\beta$ 1 Spiegel in Abhängigkeit der Histologie nachgewiesen werden (Tarantino, Conca et al. 2008). Bei Hepatitis C und HIV coinfizierten Patienten war das aktive TGF- $\beta$ 1 ebenfalls nur in den niedrigen Fibroestadien erhöht (Rallon, Barreiro et al. 2011) bei stärkerer Fibrose fiel der TGF- $\beta$ 1 Spiegel ab. Die steht im Widerspruch zu den Arbeiten von Guo bei Hepatitis B erkrankten Patienten und Leberfibrose, der eine deutliche Korrelation zwischen TGF- $\beta$  und der Fibrose nachweisen konnte (Guo, Bao et al. 2008). Es ist jedoch nicht auszuschliessen, dass es durch virusspezifische Mechanismen zu einer verstärkten Expression von TGF- $\beta$ 1 kommt (Guo, Tan et al. 2009). Bei Patienten mit Hepatitis C und Schistosomie waren die TGF- $\beta$  Spiegel ebenfalls nicht in Abhängigkeit der Fibrose erhöht (Morais, Carvalho Bde et al. 2010). Gegenüber gesunden Probanden scheint der TGF- $\beta$ 1 Spiegel bei Patienten mit Hepatitis B und C, jedoch in der Frühphase der Fibrose deutlich erhöht zu sein (Kirmaz, Terzioglu et al. 2004). Die Fibrogenese geht der Leberzirrhose vorraus, in den Spätstadien der Leberzirrhose findet kein starker fibrotischer Umbau mehr statt, so dass dies auch eine Erklärung dafür sein könnte, dass der Unterschied in den hohen Fibroestadien nicht evident ist.

Fibrose entsteht, wenn ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Abbau der extrazellulären Matrix entsteht (Uitto and Kouba 2000; Verrecchia and Mauviel 2007).

Zytokine und Wachstumsfaktoren tragen zu der Steuerung der Fibrose bei (Verrecchia and Mauviel 2002).

TGF- $\beta$ 1 ist ein wichtiger Faktor, welcher die Umwandlung von Ito-Zellen in Fibroblasten fördert. Dies führt zu gesteigerter Produktion von extrazellulärer Matrix (Schiller, Javelaud et al. 2004). Der Mechanismus, über den TGF- $\beta$ 1 dies bewirkt ist teilweise aufgeklärt. Es wirkt durch die Hemmung von Matrix-Metalloproteinasen (Yuan and Varga 2001) und durch Induktion der Kollagen-I-synthese (Jimenez, Varga et al. 1994).

Der größte Anteil von TGF- $\beta$ 1 wird von Macrophagen und Monozyten ausgeschüttet. Die Kontrolle der Menge von TGF- $\beta$ 1 erfolgt nicht nur durch Kontrolle der Expression in den Zellen, sondern auch über die Kontrolle der Ausschüttung von TGF- $\beta$ 1 aus den Zellen. Bayer konnte nachweisen, dass bei der autoimmunen Hepatitis ein erhöhter Anteil von TGF- $\beta$ 1 im Lebergewebe selbst gebildet wird (Bayer, Herr et al. 1998).

TGF- $\beta$ 1 wird in einer Propeptidform sezerniert. Es liegt somit als latentes Protein vor, welches erst durch Abspaltung seiner LAP- Region biologisch aktiv wird. Dieses latente TGF- $\beta$ 1 ist größtenteils proteingebunden und somit inaktiv. Für aktives TGF- $\beta$ 1 ist bei AIH bereits ein Anstieg des aktiven TGF- $\beta$ 1 nachgewiesen (Sakaguchi, Kitano et al. 2004). Tendentiell waren die TGF- $\beta$  Werte in unserer Untersuchung sowohl bei AIH Patienten, als auch bei PSC Patienten erhöht. Der aktive Anteil von TGF- $\beta$ 1 ist für die physiologische Wirkung des Zytokins entscheidend. Auf den Aktivierungsprozess des latenten Proteins wirken eine Reihe von verschiedenen Proteasen, wie z.B. Plasmin, Thrombin, Plasma Transglutaminase oder Endoglykosylasen ein (Roberts 1998). Es ist jedoch auch nicht auszuschliessen, dass nur der aktive Anteil verschoben ist, und deshalb ein erhöhter gesamt TGF- $\beta$ 1 Spiegel nicht nachweisbar ist. Desweiteren ist analog zum Activin die im Serum vorhandene Menge von TGF- $\beta$ 1 nicht zwangsläufig ein Anhalt für die Menge im erkrankten Gewebe. Weiteren Aufschluss könnten Messungen der Menge von TGF- $\beta$ 1 im Zielgewebe geben.

Es wäre interessant die Menge an aktivem TGF- $\beta$ 1 bei denselben Patienten zu untersuchen. Hier könnten Rückschlüsse auf die Veränderung der Relation geschlossen werden.

In Anbetracht der Variabilität der Menge des inaktiven TGF- $\beta$ 1 könnte die Untersuchung an einem größeren Patientenkollektiv eventuell einen signifikanten Unterschied nachweisen.

Activin A hat viele Aufgaben in der Differenzierung und Proliferation von verschiedenen Zellen (Woodruff 1998). Activin spielt, wie andere Proteine der TGF- $\beta$  Familie, eine Rolle in

der Fibrogenese. Bei verschiedenen fibrotischen Erkrankungen konnten erhöhte Serumspiegel von Activin nachgewiesen werden (Ohga, Matsuse et al. 1996). Follistatin ist der funktionelle Gegenspieler von Activin in der Leber (Zhang, Kanzaki et al. 1997).

Die Activin Steuerung ist sehr komplex. Dies führt dazu, dass es sehr schwierig ist einzelne Effekte von Activin, von denen anderer Zytokine zu trennen. Zum einen existieren insgesamt vier Activin beta Untereinheiten und eine Inhibin-Alpha Untereinheit, welche verschiedene Homo- und Heterodimere bilden können, diese haben unterschiedliche Affinitäten für die einzelnen Rezeptoren. Desweiteren existieren verschiedene Rezeptoren und activin-bindende Proteine, welche nicht nur mit Activin, sondern auch mit TGF-beta und BMP und GDF's interagieren. Activine und TGF-Beta benutzen unterschiedliche Rezeptoren, wirken jedoch durch die gleiche nachfolgende intrazelluläre Signalkaskade aus Smad Proteinen. Die Gabe von Follistatin scheint auch die Kollagen Induktion, welche durch TGF-Beta verursacht wird zu hemmen (Wada, Kuwano, Hasegawa 2004).

Ein Ansatz die Signalkaskade von TGF-Beta zu unterbrechen ist die Hemmung von ALK-5, verschiedene Ansätze hierfür wurden bereits unternommen. So konnte in Ratten das Fortschreiten der experimentell hervorgerufenen Leberfibrose gehemmt werden. (de Gouville, Boullay 2005)

Wegen ihres steuernden Effektes in der Fibrose sind sowohl Activin, als auch Follistatin therapeutisch interessant. Follistatin erhöht das Leberwachstum, allerdings war das nachgewachsene Gewebe nicht funktionell (Takabe, Wada 2004).

Die Fähigkeit von Follistatin die profibrinogene Aktivität von Activin A zu hemmen, hat es zum Ziel potentieller Therapieversuche gemacht (Aoki and Kojima 2007). Es konnte nachgewiesen werden, dass Activin die Lebermasse verringert, und unter Follistatingabe die Lebermasse erhöht war in Ratten (Takabe, Wang et al. 2003). Bei Bleomycin induzierter Lungenfibrose konnte nachgewiesen werden, dass Follistatin das Fortschreiten der Lungefibrose reduziert (Aoki, Kurabayashi et al. 2005). In Ratten konnte eine CCL-4 induzierte Leberfibrose unter Gabe von Follistatin gehemmt werden (Patella, Phillips et al. 2006). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die Kontrolle durch Activin A entscheidend für die Leberfunktion ist und eine exzessive Stimulierung durch Follistatin mit einer Reduktion der Leberfunktion einhergeht (Endo, Kogure et al. 2004). Activin A wird für die Beendigung des Hepatozytenwachstums und die Ausdifferenzierung des Leberlappens mit Sinusoiden und Gallengängen benötigt. Die therapeutische Gabe Activin wurde deshalb von Endo vorgeschlagen und könnte eine Möglichkeit sein die Regenerationsfähigkeit der Leber zu verbessern (Endo, Maku-Uchi et al. 2006) und sollte weiter untersucht werden.

Die vielfältigen immunmodulatorischen Effekte von Activin A und die Activinwirkung auf die verschiedenen anderen Organe müssen jedoch bei jeglichem Therapieversuch im Auge behalten werden.

### 6.1.2 Activin, Follistatin und TGF- $\beta$ und Entzündung bei AIH

Die autoimmune Hepatitis verläuft schubweise, während eines akut entzündlichen Schubes der Erkrankung kommt es zu einem Absterben der Hepatozyten. Rezidivierende Schübe führen schließlich zum Verlust der Regenerationsfähigkeit der Leber und zur Vernarbung der Leber. Bei autoimmunen Hepatitiden ist ein erhöhter Activin A-Spiegel und Follistatinspiegel noch nicht untersucht worden. Deshalb war es von besonderer Bedeutung herauszufinden, ob bei Patienten mit autoimmuner Hepatitis Activin A und Follistatin in Abhängigkeit von der entzündlichen Aktivität der Erkrankung vermehrt ausgeschüttet wird.

Zur genaueren Untersuchung von Activin A und Follistatin und Ihrer Rolle in der Entzündung bei der autoimmunen Hepatitis wurden Seren von Patienten mit AIH untersucht. Es wurden jeweils Seren zu einem Zeitpunkt der Remission mit Seren desselben Patienten zum Zeitpunkt hoher entzündlicher Aktivität verglichen. Als Surrogatmarker für die entzündliche Aktivität wurde die GPT ausgewählt, welche beim Absterben von Hepatozyten im Blut nachweisbar ist. Im Falle eines entzündlichen Schubes kommt es rasch zum Absterben von Hepatozyten und zu einem Anstieg der Transaminasen im Serum und somit auch der GPT. Activin A-, Follistatin- und TGF- $\beta$ 1 Serumspiegel wurden mittels ELISA ermittelt.

In den Untersuchungen in dieser Arbeit war zwar tendentiell ein Anstieg von Activin A in Abhängigkeit von Entzündung erkennbar, jedoch war dieser Anstieg nicht signifikant. Für Follistatin zeigte sich kein Anstieg der Serumspiegel. Das Verhältnis der beiden Proteine zueinander war ebenfalls nicht signifikant verschieden.

Verglichen mit gesunden Probanden zeigte sich nur bei starker Entzündung ein erhöhter Activin-A-Spiegel. Bei geringer Entzündung zeigte sich kein Unterschied zwischen AIH und gesunden Probanden. Bei Follistatin waren die Serumwerte sowohl bei geringer Entzündung, als auch bei starker Entzündung gegenüber gesunden Probanden signifikant erhöht. Der Quotient aus Activin A und Follistatin war dementsprechend signifikant erniedrigt.

Entzündung ist ein komplexer Vorgang. Eine Reihe von Zytokinen wirken modulierend. Neben den klassischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$  und den Interleukinen, spielen auch die

immunmodulatorischen Proteine der TGF- $\beta$  Familie eine steuernde und modulierende Rolle (Letterio, Roberts 1998). Die Rolle von Activin A in der Immunregulation wurde bereits vermutet, als man beobachtete, dass Activin A die Proliferation von Thymozyten hemmte (Hedger 1989, Hedger and Clarke 1993).

Bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen sind Activin A und Follistatinspiegel bereits untersucht worden.

Im Serum von Sepsispatienten waren Follistatin und Activin A erhöht nachweisbar (Michel 2003).

Follistatin reduzierte auch nach Endotoxin-Injektion in Mäusen die Mortalität signifikant (Jones, Mansell, Phillips 2007). Dies unterstreicht die Bedeutung, welche das Activin-Follistatin System in der Regulierung der Entzündungsreaktion hat. Die therapeutische Gabe von Follistatin in der Sepsis wird aktuell diskutiert.

Man konnte nachweisen, dass Activin A im Serum bei Patienten mit infektiösen Arthritiden und Gicht erhöht war. Activin A war bei reaktiven Osteoarthritis hingegen nicht erhöht (Yu, Dolter et al. 1998).

Bei Patienten, welche an viraler oder bakterieller Meningitis erkrankt waren, war Activin im Liquor erhöht nachweisbar. Bei Multipler Sklerose fand man keine erhöhten Activinpiegel (Michel, Ebert et al. 2000). Sowohl bei Yu, als auch bei Michel war der Anstieg von Activin A in der Synovialflüssigkeit, respektive des Liquors ausgeprägter, als im Serum.

Es ist durchaus sinnvoll, dass Follistatin im Serum bei fokaler Entzündung verstärkt ausgeschüttet wird, da sich der Körper außerhalb der Leber gegen die Wirkung von Activin schützen muss. Dies bedeutet gleichzeitig, dass man von Serumkonzentrationen von Activin und Follistatin nicht unbedingt Rückschlüsse auf die Konzentrationen in der Leber schließen kann. Interessant wären somit quantitative Messungen von Expression und Transkription von Activin und Follistatin in Leberzellen oder in der Vena hepatica während eines Schubes.

Es wurde zudem bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen, dass Activin mRNA und Expression in den entzündlichen Arealen erhöht war. Bei diesen Untersuchungen ließ sich ebenfalls eine Korrelation zwischen der Entzündungsintensität und der Höhe der Activinexpression histologisch nachweisen (Hubner, Brauchle et al. 1997).

Die intraperitoneale Gabe von Follistatin erhöhte die Überlebensrate von Ratten mit experimentell verursachter Kolitis signifikant (Dohi, Ejima et al. 2005).

Auch zu entzündlichen Lebererkrankungen sind bereits Studien durchgeführt worden.

In den Arbeiten von Patella wurde bei Patienten mit Hepatitis C kein Unterschied hinsichtlich der Entzündungsaktivität nachgewiesen. Patienten mit Hepatitis C und Hepatitis B hatten

jedoch einen höheren Activin-A-Serumspiegel als gesunde Probanden. Dies bestätigt auch unsere Ergebnisse. Das Verhältnis von Activin A und Follistatin verschob sich zu Gunsten des Activin A's (Patella, Phillips et al. 2001). Patella konnte bei Patienten, die an einer Hepatitis B erkrankt waren, hingegen einen erhöhten Activin-A-Serumspiegel in Abhängigkeit der entzündlichen Aktivität nachweisen. Dieser Unterschied kann jedoch durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der Immunzellen und einer unterschiedlichen Immunpathogenese bei Hepatitis B und den übrigen Lebererkrankungen verursacht worden sein (Patella, Phillips et al. 2001).

Die Arbeiten von Lin zeigten, dass Follistatin bei akutem Leberversagen verstärkt exprimiert wird. In dieser Arbeit wurde ebenso ein Verhältnis zwischen Activin und Follistatin gebildet, es verschob sich in der Entzündungsreaktion in Richtung Activin A und es wurde als negativer Prognosefaktor für Patienten mit akutem Leberversagen vorgeschlagen (Lin, Kawakami et al. 2006).

Für Activin A und Follistatin ist eine steuernde Rolle in der Entzündung bereits beschrieben.

Activin A stimuliert die Erythropoese. Es wirkt es aktivierend auf Monozyten und Makrophagen von Ratten (Yu, Shao et al. 1996). Activin A stimuliert die Ausschüttung von IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  (Jones, Mansell et al. 2007).

Auf der anderen Seite wirkt Activin A immunsupprimierend. Activin A kann die B-Zell Produktion hemmen durch Hemmung der Sekretion von IL-6 (Brosh, Sternberg et al. 1995). Activin hemmt jedoch nicht nur die Proliferation von B-Zellen, sondern auch die von T-Zellen (Hedger, Drummond et al. 1989; Hedger and Clarke 1993; Sternberg, Honigwachs-sha'anani et al. 1995). Weitere Studien zeigen Hinweise darauf, dass Activin A regulierende Wirkung auf Lymphozyten im Knochenmark hat (Zipori and Barda-Saad 2001).

In Schafen kam es nach der Gabe von LPS und IL1 $\beta$  zur gesteigerten Ausschüttung von Follistatin und Activin A (Klein, Clarke et al. 1996; Jones, Brauman et al. 2000). Die Ausschüttung von Follistatin erfolgte sehr kurzfristig nach Injektion zusammen mit anderen Akute Phase Proteinen. Bei Activin A erfolgte die Ausschüttung mit einem Punctum maximum bereits nach 30 Minuten, und einem zweiten Höhepunkt nach ungefähr 3 Stunden (Jones, de Kretser et al. 2004). Der schnelle Serumanstieg lässt darauf schließen, dass Activin in der akuten Phase der Entzündung aus zellulären Speichern ausgeschüttet wird und nicht durch gesteigerte Expression. Nach 5 Stunden sank der Activin-A-Serumspiegel wieder auf das Ausgangsniveau.

Es wird vermutet, dass die Follistatinausschüttung als Reaktion auf die Activinserumspiegelerhöhung erfolgt. Dagegen spricht jedoch die autonome Follistatinausschüttung nach LPS Gabe in vitro (Michel, Schneider et al. 1996).

Die schnelle Ausschüttung kann dazu führen, dass Serumunterschiede schwierig zu detektieren sind. Da mit der akuten Entzündung bei der AIH auch eine beginnende Fibrose einhergeht, ist es in dieser Untersuchung schwierig die Unterschiede der Serumspiegel alleine mit der Entzündungsreaktion zu erklären. Dies wird dadurch gestützt, dass sowohl die Activin als auch die Follistatin Serumwerte bereits bei der Erkrankung in Remission tendenziell erhöht waren.

Man weiß noch nicht, welche Zellen für die Erhöhung des Activins im Serum verantwortlich sind. Woodruff konnte bei Experimenten mit radioaktiv markiertem Activin nachweisen, dass die Leber die höchste Bindung von Activin aufwies. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Leber ein wichtiges Zielorgan für Activin ist (Woodruff, Krummen et al. 1993). Indizien hierfür sind auch, dass sich die Mehrheit der Activin Rezeptoren Typ II in der Leber (Mathews and Vale 1993) befinden. Dies unterstreicht ebenfalls die zentrale Rolle der Leber im Regelkreis des Activins. Activin wirkt autokrin und parakrin, deshalb ist es wahrscheinlich, dass bei Entzündung und Fibrose der Leber die Quelle des Serumactivins in der Leber selbst zu suchen ist.

Bei gesamt TGF- $\beta$ 1 konnte ein Unterschied bei Patienten mit hoher GPT im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden. In Abhängigkeit der Entzündung war jedoch kein Unterschied nachweisbar.

Dies bestätigt die Ergebnisse von Bayer (Bayer, Herr et al. 1998). Sie konnte ebenfalls einen signifikant erhöhten Serumspiegel gegenüber gesunden Probanden bei starker Entzündung nachweisen. Bayer konnte jedoch auch eine Korrelation in Bezug auf die entzündliche Aktivität nachweisen. Bayer benutzte jedoch als Surrogatmarker die GOT und niedrigere Grenzwerte für die Remission, dies könnte den Unterschied erklären. Die Untersuchung eines größeren Patientenkollektives könnte aufschlussreich sein, um eine Korrelation zu belegen.

Für aktives TGF- $\beta$ 1 konnte nachgewiesen werden, dass es im Serum von Patienten im akuten Schub einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung signifikant erhöht war. Bei diesen Untersuchungen wurde das latente TGF- $\beta$ 1 jedoch nicht gemessen (Kilic, Ayaz et al. 2009).

In den meisten Arbeiten über TGF- $\beta$ 1 wurde das aktive TGF- $\beta$ 1 untersucht, welches innerhalb eines akuten entzündlichen Geschehens schnell reagiert. Das aktive TGF- $\beta$  hat eine sehr kurze Halbwertszeit von nur 3 Minuten und wird in der Leber unter anderem von Hepatozyten

aktiviert (Jakowlew, Mead et al. 1991). Dies führt dazu, dass die Menge an TGF- $\beta$ 1 nicht nur durch gesteigerte Expression gesteuert werden kann, sondern auch durch gesteigerte Aktivierung. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich auch das latente TGF- $\beta$ 1 im Falle eines akuten Schubes einer AIH erhöht. Diese Erhöhung ist bei einer in Remission befindlichen AIH gegenüber gesunden Patienten nicht nachweisbar.

Bei den Messungen des gesamt TGF- $\beta$ 1 sind die Schwankungen des proteingebundenen und inaktiven Anteils oft so hoch, dass statistisch nachweisbare Veränderungen schwierig darzustellen sind. Von großem Interesse wäre auch ein Vergleich des latenten und aktivem TGF- $\beta$ 1. Da kurzfristige Änderungen innerhalb der Entzündungsreaktion wahrscheinlich auch das Verhältnis verändern.

Die Rolle von TGF- $\beta$ 1 in der Immunreaktion ist steuernd. Unter TGF- $\beta$ 1 kommt es in Abhängigkeit von weiteren Zytokinen zur Regulation der T-Zell Population.

TGF- $\beta$ 1 Knockout Mäuse zeigten eine systemische Entzündung, und verstarben innerhalb der ersten Wochen nach Geburt daran. Dies unterstreicht die immunsuppressive Wirkung von TGF- $\beta$ 1 (Shull, Ormsby et al. 1992).

Die autoimmune Hepatitis ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung bei der es zu Störungen der Toleranzentwicklung kommt. TGF- $\beta$ 1 hemmt die überschießende Immunreaktion, indem es die Lymphozytenproliferation und die NK-Zellen Produktion hemmt. Außerdem kann es die Funktion von Lymphozyten und Monozyten beeinflussen (Roberts and Sporn 1993). Es wird angenommen, dass es im Falle der AIH einen hemmenden Einfluss auf die Entzündungsreaktion ausübt und zu einer spontanen Remission der AIH führen kann (Lohse, Kogel et al. 1995).

TGF- $\beta$ 1 ist entscheidend für Differenzierung von T- regulatorischen T-Zellen Zellen. T-regulatorische T-Zellen induzieren eine Toleranz und können eine überschüssige Immunreaktion hemmen. Ein Ungleichgewicht zwischen regulatorischen T-Zellen und Th17 Zellen könnte zu der Entstehung von autoimmunen Erkrankungen führen (Vojdani and Erde 2006). Es unterhält die autoimmune Reaktion und ist entscheidend am Fortschreiten der Erkrankung beteiligt. (Bettelli, Carrier et al. 2006).

Die erhöhten Serumspiegel von TGF- $\beta$ 1 bei der AIH führen also zu einer gesteigerten Immuntoleranz, allerdings führen Sie wahrscheinlich durch die profibrinogene Wirkung ebenfalls zu einer schnelleren Progression zur Leberfibrose. Dies macht eine therapeutische Anwendung von TGF- $\beta$ 1 kompliziert.

## 6.2 Die Genexpressionskassetten

### Vektoren zur Generierung transgener Mäuse

Zur weiteren Untersuchung der Zusammenhänge von Activin  $\beta$ A und Follistatin wurden im Rahmen dieser Arbeit Genexpressionskassetten generiert, die es erlauben Activin A und Follistatin auf T-Zellen und in der Leber von Mäusen in verstärktem Maße zu exprimieren. Follistatin wirkt dann als funktioneller Antagonist des Activins.

Es ist möglich, mit einer Reihe von Methoden die biologische Aktivität von Proteinen zu untersuchen. Man kann das Protein injizieren, oder einen Antikörper gegen das Protein injizieren, um die Funktion des Proteins zu blockieren. Diese Methoden sind teuer und lassen nur einen begrenzten Schluss auf die Proteinfunktion zu, da man nicht genau weiß, ob das Protein komplett gebunden wurde und somit in seiner Funktion komplett ausgeschaltet wurde. Vor allem bei autokriner oder parakriner Funktion des Proteins ist es schwierig das Protein zu blockieren, bevor es bereits seine Wirkung entfaltet. Weitaus aussagekräftiger sind Studien an transgenen Mäusen, die zudem noch eine Aussage auf die Entwicklung und Differenzierung vor der Geburt zulassen.

Aufgrund ihres kurzen Reproduktionszyklus und ihrer relativ langen Zeugungsfähigkeit, haben sich Mäuse als Modell für transgene Studien etabliert. In vielen Laboren ist es mittlerweile möglich Mäuse mittels Pronukleusinjektion in befruchtete Eizellen genetisch zu verändern.

TGF- $\beta$ 1 Knockoutmäuse sterben kurz nach der Geburt an inflammatorischen Infiltraten, die in vielen Organen vorkamen (Kulkarni, Huh et al. 1993). Dies unterstreicht die Bedeutung von TGF- $\beta$  in der Regulierung der Entzündungsreaktion. Es wurde auch vermutet, dass TGF- $\beta$ 1 die Plazentaschranke überwindet, und so von der Mutter den Embryo mitversorgen kann, sollte es zu einem Ausfall des Proteins kommen. Ausfallserscheinungen scheinen in der Stillzeit seltener zu sein, weshalb man eine Versorgung des Neugeborenen über die Muttermilch vermutet (Letterio, Geiser et al. 1994). In Versuchen mit Mäusen die TGF- $\beta$ 1 unter einem induzierbaren CRP-Promotor exprimierten wurden bereits nach 6 Wochen eine beginnende Fibrosierung der Leber festgestellt (Kanzler, Lohse et al. 1999). Dies bestätigt die Wirkung auf die Myofibroblasten und den profibrotischen Charakter der Proteine der TGF- $\beta$  Familie, und lässt ähnliches auch für das Activin bzw. Follistatin vermuten. In Leberbiopsien bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen waren die mRNA-Spiegel von TGF- $\beta$ 1 und Prokollagen 1

sehr eng miteinander korreliert (Castilla, Prieto et al. 1991). Bei anderen Mitgliedern der TGF- $\beta$  Familie, auch bei Activin, wird dies ebenfalls vermutet.

Studien mit Knockoutmäusen für Activin haben gezeigt, dass Activin bei Wachstum und Differenzierung eine wichtige Rolle spielt. So starben Activin A Knockoutmäuse innerhalb der ersten 24 Stunden wegen starker kraniofaszialer Missbildungen, die die Nahrungsaufnahme behinderten. Interessanterweise haben Follistatin Knockoutmäuse ebenfalls Missbildungen in Gaumen, Schnurrhaaren und Schneidezähnen (Matzuk, Kumar et al. 1995). Sie haben allerdings desweiteren noch Wachstumsverzögerungen, Missbildungen am Zwerchfell und an der 13. Rippe. Die Mäuse sterben innerhalb der ersten Stunden nach Geburt.

Activin Knockoutmäuse eignen sich nicht für die Untersuchungen an der Leberfibrose, da sie früh nach Geburt sterben. Viele Krankheiten brauchen lange um sich zu entwickeln, so z.B. die Leberfibrose. Um die Wirkungen von Activin und Follistatin isoliert zu beobachten, ist es von Interesse Proteine isoliert in einzelnen Geweben über zu exprimieren. Follistatin könnte hier als funktioneller Knockout des Activin wirken, da man davon ausgehen kann, dass in einem Gewebe, das Follistatin überexprimiert, die Wirkung von Activin nahezu neutralisiert wird. Follistatin wirkt jedoch nicht nur hemmend auf Activin, es interagiert auch mit anderen Mitgliedern der TGF- $\beta$  Familie, z.B. den BMP's (Thomsen 1997). Auch eine autonome Wirkung von Activin wurde beschrieben, so dass durch die Blockade von Activin mittels Überexpression von Follistatin, nicht nur eine Antagonisierung von Activin  $\beta$  erreicht wird, sondern auch eine partielle Blockade anderer Zytokine.

In Studien konnte nachgewiesen werden, dass Activin in unterschiedlichen Konzentrationen unterschiedliche Funktionen erfüllt. Die Integration der Vektoren in das Genom der Maus kann nicht gesteuert werden. Hieraus ergeben sich in Abhängigkeit der Integrationsstelle unterschiedliche Expressionsraten. Dies kann zu unterschiedlichen Ergebnissen in darauffolgenden Experimenten führen.

### 6.2.1. Vektoren unter dem Albuminpromotor

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Vektoren kloniert, welche das Activin  $\beta$ A- und das Follistatin unter der Kontrolle eines Albuminpromotors und eines Enhancers exprimieren sollen. Der Albuminpromotor wurde ausgewählt, um eine leberspezifische Expression zu gewährleisten. Dies ermöglicht die isolierte Betrachtung der Wirkung von Activin in der Leber.

Insulatoren sollen die Genexpression stabilisieren. Schliesslich wurde der bakterielle Vektor mittels Restriktionsenzymverdau und Gelaufreinigung entfernt. Die Konstrukte wurden sequenziert, und in Zellkultur ausgetestet. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Translation in Hep G2 Zellen stattfindet.

Durch Injektion von rekombinantem Activin in Ratten verminderte sich die Lebergröße. Hohe Dosen von Activin verursachen Nekrosen der Zellen im Bereich der Zentralvene (Schwall, Robbins et al. 1993).

Studien in denen mittels Adenoviren Activin und Follistatin in der Leber überexprimiert wurde zeigten, dass durch Überexpression von Follistatin die Leber auf das 1½ fache der normalen Lebergröße wuchs. Die Größenzunahme wurde mit dem vermehrten Hepatozytenwachstum begründet. Man konnte eine direkte Korrelation zwischen dem Follistatinspiegel und der Lebergröße nachweisen (Takabe, Wang et al. 2003).

Diese Versuche können jedoch nur zeitlich begrenzt durchgeführt werden, da die Leberzellen nur transient transfiziert werden, und mit den Teilungen der Hepatozyten immer weniger Activin bilden. Auch bildet der Organismus mit der Zeit Antikörper gegen die Adenoviren, die eine spätere virale Transfektion unmöglich machen. In einem transgenen Mausmodell könnte die Wirkung über einen langen Zeitraum untersucht werden. Die Übertragbarkeit auf den Menschen ist jedoch auf Grund der Lebenszeit von 2-3 Jahren für Mäuse weiterhin begrenzt. Die Entwicklung der Leberzirrhose beim Menschen vollzieht sich über viele Jahre.

In Schlussfolgerung aus den zuvor beschriebenen Experimenten könnte man für die transgenen Mäuse, die mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Activin-Plasmid generiert werden, eine verfrühte Leberzirrhose mit einem eventuell verkleinerten Lebervolumen erwarten. Wahrscheinlich führt die gesteigerte Umwandlung von Ito-Zellen zu einer Erhöhung der extrazellulären Matrix und schließlich zur Leberfibrose.

Bei den Follistatin-Mäusen könnte man ähnlich den Mäusen, die Follistatin mittels adenoviraler Vektoren überexprimieren, eine Zunahme des Lebervolumens erwarten. Da sich Follistatin in verschiedenen Studien als protektiv gegenüber einer zirrhotischen Veränderung erwiesen hat, wäre es interessant das Ausmaß dieses Schutzes in Fibrosemodellen genauer zu untersuchen. Auch ist es in beiden Fällen von großem Interesse die embryonale Entwicklung der Leber zu untersuchen, sowie in Hepatektomie-Experimenten die Regeneration zu analysieren. Aufgrund des Einflusses von Activin A und Follistatin auf die Proliferation und Apoptose soll des Weiteren die Hepatokarzinogenese untersucht werden.

## 6.2.2. Vektoren unter dem T-Zell Promotor:

Mit Hilfe der Vektoren, die ActivinA und Follistatin unter Kontrolle eines T-Zell Promotors exprimieren, könnten die Wirkungen von Activin A und Follistatin auf das Immunsystem weiter erforscht werden. Für andere Vertreter der TGF- $\beta$  Familie ist bereits bekannt, dass sie eine steuernde Rolle in der Immunreaktion haben. Insbesondere TGF- $\beta$ 1 wirkt immunsuppressiv.

Für Activin A wird eine steuernde Rolle in der Entzündung vermutet, da es die Migration von Zellen des monozytären Systems verstärkte (Yu, Shao et al. 1996) und in vielen chronischen Entzündungen erhöht ist. Activin A wird von vielen Zellen des Immunsystems exprimiert (z.B. Makrophagen) (Ogawa, Funaba et al. 2000), Monozyten (Luisi, Florio et al. 2001), Mastzellen (Funaba, Ikeda et al. 2003). Es ist allerdings wenig bekannt über die Funktionen, die Activin A in der Immunreaktion übernimmt. Activin A wird in TH-2 Lymphozyten von Menschen (Karagiannidis, Hense et al. 2006) und Mäusen im Rahmen einer entzündlichen Reaktion induziert (Ogawa, Funaba et al. 2006).

Einige Studien postulieren einen inhibitorischen Effekt von Activin A auf TH2 Zellen und B-Zellen in Mäusen (Yu, Shao et al. 1996; Werner and Alzheimer 2006) auf NK-Zellen (Robson, Wei et al. 2009). Andere Studien zeigen wiederum den pro inflammatorischen Effekt von Activin A in vivo nach Gabe von Endotoxin oder Allergen in Mäusen (Hardy, O'Connor et al. 2006; Jones, Mansell et al. 2007).

Insgesamt betrachtet scheint Activin A eine Doppel-Rolle in der Entzündungsmediation zu spielen (Veldhoen, Hocking et al. 2006; Zenewicz, Yancopoulos et al. 2008).

T-Helfer Zellen exprimieren Activin A nach Aktivierung. Activin A wurde nur in CD4+CD25-Zellen nachgewiesen. Es wird nicht von CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen produziert. Es wirkt auf Makrophagen und stimuliert sie zur Produktion von Arginase-1 (Ogawa, Funaba et al. 2006).

Für Mäuse, die auf T-Zellen Activin A überexprimieren könnte analog zu TGF- $\beta$ 1 Mäusen eine Störung der Entzündungsreaktion erwartet werden. Mäuse die TGF- $\beta$ 1 nicht exprimieren leiden unter multifokalen Entzündungen (Shull, Ormsby et al. 1992). TGF- $\beta$  stört die Differenzierung und Proliferation von T-Zellen und induziert Apoptose in diesen Zellen (Gorelik and Flavell 2002). In den meisten Studien hatten Activin A und TGF- $\beta$  ähnliche Funktionen. In der Immunantwort scheinen die Funktionen von Activin und TGF- $\beta$  jedoch unterschiedlich zu sein. Activin A scheint die Entzündung positiv zu regulieren. Es induziert die Produktion von Matrix Metalloproteinase-2 in Makrophagen des Peritoneums (Ogawa,

Funaba et al. 2000). In Makrophagen und Mastzellen war nach Stimulierung Activin A aber nicht TGF- $\beta$  hochreguliert (Funaba, Ikeda et al. 2003). Activin Expression konnte nur in TH-2 Zellen nachgewiesen werden (Ogawa, Funaba et al. 2006). In der Immunantwort wirkt Activin A vor allem auf Mastzellen und Makrophagen. Mastzellen sind Teil der TH-2 gesteuerten Immunantwort, wie allergisch induzierter Entzündung und direkter Hypersensitivität (Immunreaktion Typ I) (Mirmonsef, Shelburne et al. 1999).

Die Vektoren die im Rahmen unserer Arbeiten kloniert wurden können einen Beitrag zur Erforschung der immunmodulatorischen Wirkungen von Activin A und Follistatin leisten. Jetzige Forschungsergebnisse zeigen einen kontrollierenden und begrenzenden Einfluss von Activin. Aufgrund der Komplexität des Zytokinsystems und der gegenseitigen Beeinflussung der einzelnen Mitglieder ist eine Überprüfung der Ergebnisse in vivo und vitro von großem Interesse.

Der Einfluss von Activin auf immunologischer Ebene ist ein interessantes Gebiet und Mäuse, die Follistatin überexprimieren könnten eine verminderte inflammatorische Antwort aufweisen, als es Activin überexprimierende Mäuse zeigen. Mit Hilfe dieser transgenen Mäuse könnten die komplizierten Vorgänge der Immunreaktion und die Funktion der Zytokine eingehender in vivo erforscht werden

## 7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Activin und Follistatin bei Patienten mit PSC und AIH untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass Activin in Abhängigkeit der Fibrose der Leber bei PSC und AIH erhöht sind. Dies könnte Activin als Marker zur Einschätzung des Fortschreitens einer Lebererkrankung qualifizieren. Es zeigte sich eine deutlicher Erhöhung des Activin-Serumspiegel vor allem in der Frühphase der Fibrose bei Patienten mit PSC und Hepatitis C im Vergleich mit gesunden Probanden. Die Expression von Activin wurde histologisch in Lebern von PSC Patienten nachgewiesen. Follistatin-Serumspiegel zeigte keine Veränderung in Abhängigkeit der Fibrose, sie waren jedoch im Vergleich zu gesunden Probanden ebenfalls erhöht nachweisbar.

Zudem wurden die Serumspiegel von Activin und Follistatin in Abhängigkeit der Entzündungsaktivität bei Patienten mit einer aktiven AIH untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit aktiver AIH Activin und Follistatin gegenüber gesunden Probanden erhöht war. War die Erkrankung in Remission, zeigten sich für keine erhöhten Activin-Serumspiegel. Für Follistatin konnte nachgewiesen werden, dass es sowohl in Remission als auch im akuten Schub einer AIH im Serum erhöht nachweisbar war.

Desweiteren wurden TGF- $\beta$ 1 Gesamtspiegel im Serum untersucht. Es zeigte sich keine Abhängigkeit der Serumspiegel vom Fibrosegrad. Gesamt TGF- $\beta$ 1-Serumspiegel waren im akuten Schub der AIH gegenüber gesunden Probanden erhöht.

Zur genaueren Untersuchung der Rolle von Activin in der Leber und in der Regulierung des Immunsystems wurden Vektoren zur Generierung transgener Mäuse geklont.

Es wurden Konstrukte aufgereinigt und vorbereitet, die eine hepatozytenspezifische Expression von Activin beziehungsweise Follistatin in Hepatozyten ermöglichen. Diese Konstrukte wurden in Zellkultur überprüft und es konnte Ihre Funktionalität bis auf mRNA Ebene nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieser Konstrukte kann die Rolle von Activin in der Leberfibrose und –entzündung in vivo untersucht werden.

Ein zweites Konstrukt, welches die Expression von Activin und Follistatin unter einem T-Zell Promotor steuert, kann Aufschluss über die Rolle von Activin in der Regulierung des Immunsystems geben.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
Act	Activin
AIH	Autoimmune Hepatitis
AS	Aminosäuren
BAMBI	BMP and membrane bound Inhibitor
BFU-E	Burst forming unit- erythroid
BMP	Bone morphogenetic protein
CEB	Cyclo AMP bindendes Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
CFU-GEMM	Colony forming unit- granulocyte, erythrocytes, macrophages, megakaryocytes
CIP	Calf intestinal phosphatase
CREB	cAMP response element binding protein
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
E. coli	Escherichia coli
EDF	Erythroid differenciation factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
FSH	Follikel Stimulierendes Hormon
FSRP	Follistatin related protein
GDF	Growth/differentiation factor
HEPES	N <sub>2</sub> - Hydroxyethylpiperacin N <sub>2</sub> Ethanschweiflige Säure
HRP	Horse-Raddish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IL	Interleukin
InhBP	Inhibin bindendes Protein
kDA	Kilo Dalton
LAP	Latency associated peptide
LB	Luria Broth
mFs	Maus Follistatin
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
OD	Optische Dichte
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
pg	Picogramm
pH	Potentia Hydrogenii
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
RNS	Ribonukleinsäure
SARA	Smad anchor for receptor activation
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBS	Tris buffered saline
TF	Transkriptionsfaktoren
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRIP	TGF-β receptor interacting protein 1

TSA	Tyramid signal amplification
TSP-1	Thrombospondin-1
U	Umdrehungen
UV	Ultra violett

# 9. Anhang: Genkarten

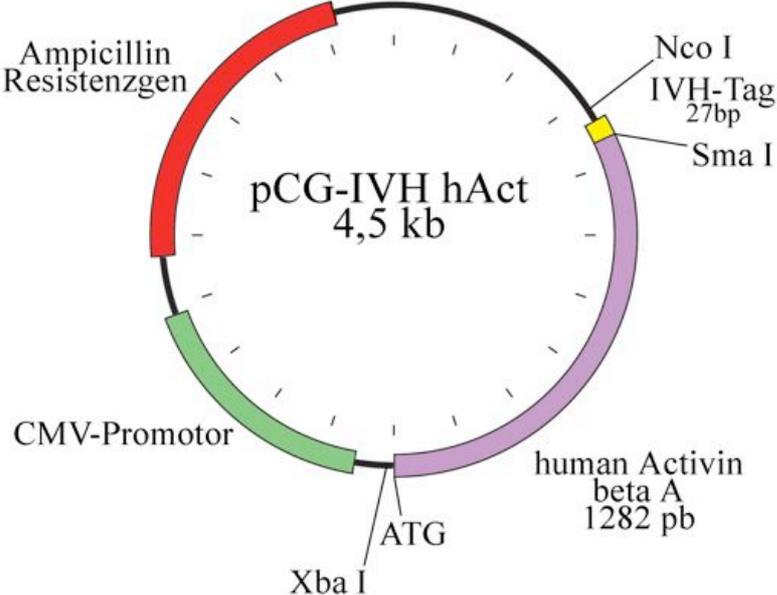


Abb. 59: Vektorkarte des Activin Vektors (freundliche Gabe von Frau Prof. S. Werner, ETH Zürich)

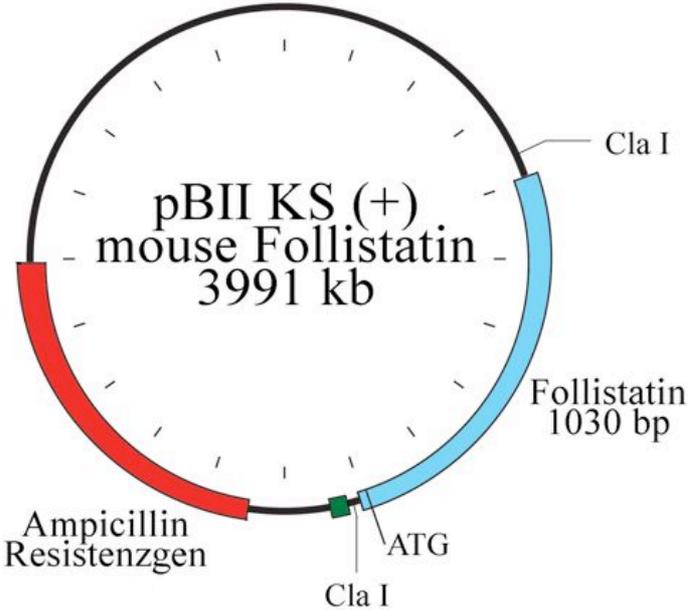


Abb. 60: Vektorkarte des Follistatin Vektors (freundliche Gabe von Frau Prof. S. Werner, ETH Zürich)

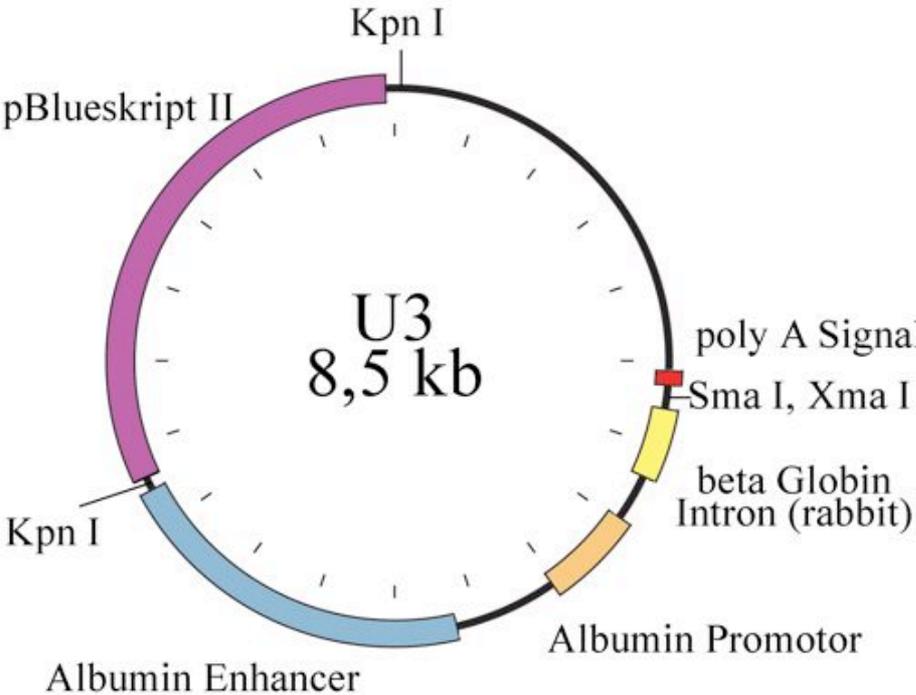


Abb. 61: Vektorkarte des U3 Vektors

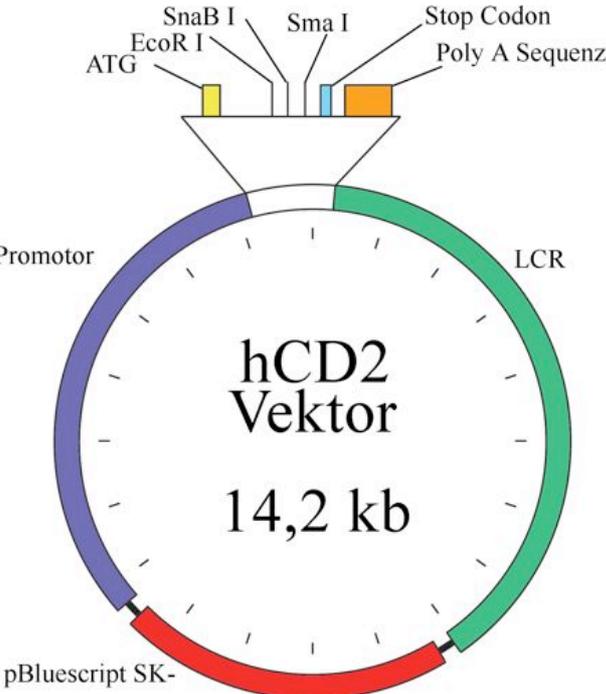


Abb. 62: Vektorkarte des hCD2 Vektors

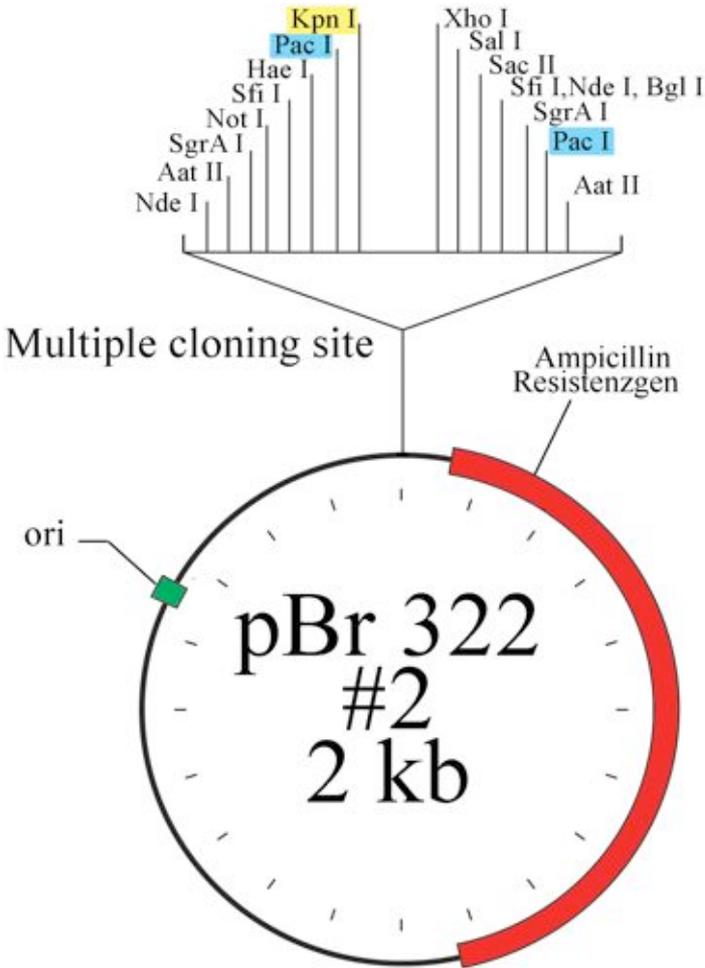


Abb. 63: Vektorkarte des pBr 322#2 Vektors

## 10. Literaturverzeichnis

- Abe, Y., T. Minegishi, et al. (2004). "Activin receptor signaling." *Growth Factors* 22(2): 105-110.
- Ahmad, S., M. A. Choudhry, et al. (1997). "Transforming growth factor-beta negatively modulates T-cell responses in sepsis." *FEBS Lett* 402(2-3): 213-218.
- Alcolado, R., M. J. Arthur, et al. (1997). "Pathogenesis of liver fibrosis." *Clin Sci (Lond)* 92(2): 103-112.
- Alvarez, F., P. A. Berg, et al. (1999). "International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis." *J Hepatol* 31(5): 929-938.
- Aoki, F. and I. Kojima (2007). "Therapeutic potential of follistatin to promote tissue regeneration and prevent tissue fibrosis." *Endocrine journal* 54(6): 849-854.
- Aoki, F., M. Kurabayashi, et al. (2005). "Attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by follistatin." *American journal of respiratory and critical care medicine* 172(6): 713-720.
- Attisano, L., J. Carcamo, et al. (1993). "Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors." *Cell* 75(4): 671-680.
- Attisano, L., C. Silvestri, et al. (2001). "The transcriptional role of Smads and FAST (FoxH1) in TGFbeta and activin signalling." *Mol Cell Endocrinol* 180(1-2): 3-11.
- Attisano, L. and S. Tuen Lee-Hoeflich (2001). "The Smads." *Genome Biol* 2(8): REVIEWS3010.
- Bachman, K. E. and B. H. Park (2005). "Duel nature of TGF-beta signaling: tumor suppressor vs. tumor promoter." *Curr Opin Oncol* 17(1): 49-54.
- Baeres, M., J. Herkel, et al. (2002). "Establishment of standardised SLA/LP immunoassays: specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence, and clinical characteristics." *Gut* 51(2): 259-264.
- Barbara, N. P., J. L. Wrana, et al. (1999). "Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily." *J Biol Chem* 274(2): 584-594.
- Bayer, E. M., W. Herr, et al. (1998). "Transforming growth factor-beta1 in autoimmune hepatitis: correlation of liver tissue expression and serum levels with disease activity." *Journal of hepatology* 28(5): 803-811.

Bayer, E. M., W. Herr, et al. (1998). "Transforming growth factor-beta1 in autoimmune hepatitis: correlation of liver tissue expression and serum levels with disease activity." *J Hepatol* 28(5): 803-811.

Bergquist, A., A. Ekbom, et al. (2002). "Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis." *J Hepatol* 36(3): 321-327.

Bettelli, E., Y. Carrier, et al. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." *Nature* 441(7090): 235-238.

Boberg, K. M., E. Aadland, et al. (1998). "Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population." *Scand J Gastroenterol* 33(1): 99-103.

Braun, L., J. E. Mead, et al. (1988). "Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(5): 1539-1543.

Breitkopf, K., P. Godoy, et al. (2006). "TGF-beta/Smad signaling in the injured liver." *Z Gastroenterol* 44(1): 57-66.

Brosh, N., D. Sternberg, et al. (1995). "The plasmacytoma growth inhibitor restrictin-P is an antagonist of interleukin 6 and interleukin 11. Identification as a stroma-derived activin A." *J Biol Chem* 270(49): 29594-29600.

Brosh, N., D. Sternberg, et al. (1995). "The plasmacytoma growth inhibitor restrictin-P is an antagonist of interleukin 6 and interleukin 11. Identification as a stroma-derived activin A." *The Journal of biological chemistry* 270(49): 29594-29600.

Brown, C. W., D. E. Houston-Hawkins, et al. (2000). "Insertion of *Inhbb* into the *Inhba* locus rescues the *Inhba*-null phenotype and reveals new activin functions." *Nat Genet* 25(4): 453-457.

Brown, T. L., S. Patil, et al. (2000). "Analysis of TGF-beta-inducible apoptosis." *Methods Mol Biol* 142: 149-167.

Broxmeyer, H. E., L. Lu, et al. (1988). "Selective and indirect modulation of human multipotential and erythroid hematopoietic progenitor cell proliferation by recombinant human activin and inhibin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(23): 9052-9056.

Butler, C. M., E. J. Gold, et al. (2005). "Should activin betaC be more than a fading snapshot in the activin/TGFbeta family album?" *Cytokine Growth Factor Rev* 16(4-5): 377-385.

Canbay, A., S. Friedman, et al. (2004). "Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis." *Hepatology* 39(2): 273-278.

Castilla, A., J. Prieto, et al. (1991). "Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy." *N Engl J Med* 324(14): 933-940.

Chang, H., C. W. Brown, et al. (2002). "Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily." *Endocr Rev* 23(6): 787-823.

Chang, H., A. L. Lau, et al. (2001). "Studying TGF-beta superfamily signaling by knockouts and knockins." *Mol Cell Endocrinol* 180(1-2): 39-46.

Chapman, R. W., B. A. Arborgh, et al. (1980). "Primary sclerosing cholangitis: a review of its clinical features, cholangiography, and hepatic histology." *Gut* 21(10): 870-877.

Chapman, S. C., D. J. Bernard, et al. (2002). "Properties of inhibin binding to betaglycan, InhBP/p120 and the activin type II receptors." *Mol Cell Endocrinol* 196(1-2): 79-93.

Cheifetz, S. and J. Massague (1991). "Isoform-specific transforming growth factor-beta binding proteins with membrane attachments sensitive to phosphatidylinositol-specific phospholipase C." *J Biol Chem* 266(31): 20767-20772.

Chen, Y. G., Q. Wang, et al. (2006). "Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis." *Exp Biol Med (Maywood)* 231(5): 534-544.

Choy, L. and R. Derynck (1998). "The type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor-interacting protein TRIP-1 acts as a modulator of the TGF-beta response." *J Biol Chem* 273(47): 31455-31462.

Clouthier, D. E., S. A. Comerford, et al. (1997). "Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-beta1 transgenic mice." *The Journal of clinical investigation* 100(11): 2697-2713.

Czaja, A. J., D. G. Doherty, et al. (2002). "Genetic bases of autoimmune hepatitis." *Dig Dis Sci* 47(10): 2139-2150.

Dale, K., N. Sattar, et al. (1999). "Differential patterning of ventral midline cells by axial mesoderm is regulated by BMP7 and chordin." *Development* 126(2): 397-408.

Date, M., K. Matsuzaki, et al. (2000). "Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury." *J Hepatol* 32(2): 251-260.

De Bleser, P. J., T. Niki, et al. (1997). "Localization and cellular sources of activins in normal and fibrotic rat liver." *Hepatology* 26(4): 905-912.

de Winter, J. P., P. ten Dijke, et al. (1996). "Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors." *Mol Cell Endocrinol* 116(1): 105-114.

Deckers, M., M. van Dinther, et al. (2006). "The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells." *Cancer Res* 66(4): 2202-2209.

Derynck, R., J. A. Jarrett, et al. (1985). "Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells." *Nature* 316(6030): 701-705.

Dohi, T., C. Ejima, et al. (2005). "Therapeutic potential of follistatin for colonic inflammation in mice." *Gastroenterology* 128(2): 411-423.

Dooley, S., B. Delvoux, et al. (2000). "Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts." *Hepatology* 31(5): 1094-1106.

Dubois, C. M., M. H. Laprise, et al. (1995). "Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase." *J Biol Chem* 270(18): 10618-10624.

Endo, D., K. Kogure, et al. (2004). "Activin A augments vascular endothelial growth factor activity in promoting branching tubulogenesis in hepatic sinusoidal endothelial cells." *Journal of hepatology* 40(3): 399-404.

Endo, D., M. Maku-Uchi, et al. (2006). "Activin or follistatin: which is more beneficial to support liver regeneration after massive hepatectomy?" *Endocr J* 53(1): 73-78.

Eng, F. J. and S. L. Friedman (2000). "Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(1): G7-G11.

Fang, J., W. Yin, et al. (1996). "Molecular cloning of the mouse activin beta E subunit gene." *Biochem Biophys Res Commun* 228(3): 669-674.

Feijen, A., M. J. Goumans, et al. (1994). "Expression of activin subunits, activin receptors and follistatin in postimplantation mouse embryos suggests specific developmental functions for different activins." *Development* 120(12): 3621-3637.

Feld, J. J. and E. J. Heathcote (2003). "Epidemiology of autoimmune liver disease." *J Gastroenterol Hepatol* 18(10): 1118-1128.

Funaba, M., T. Ikeda, et al. (2003). "Transcriptional activation of mouse mast cell Protease-7 by activin and transforming growth factor-beta is inhibited by microphthalmia-associated transcription factor." *J Biol Chem* 278(52): 52032-52041.

Funaba, M., T. Ikeda, et al. (2003). "Role of activin A in murine mast cells: modulation of cell growth, differentiation, and migration." *Journal of leukocyte biology* 73(6): 793-801.

Funaba, M., K. Ogawa, et al. (1996). "Follistatin and activin in bone: expression and localization during endochondral bone development." *Endocrinology* 137(10): 4250-4259.

Ghahary, A., Y. J. Shen, et al. (1993). "Enhanced expression of mRNA for transforming growth factor-beta, type I and type III procollagen in human post-burn hypertrophic scar tissues." *J Lab Clin Med* 122(4): 465-473.

Gilbert, R. S., S. T. Reddy, et al. (1994). "Transforming growth factor beta 1 augments mitogen-induced prostaglandin synthesis and expression of the TIS10/prostaglandin synthase 2 gene both in Swiss 3T3 cells and in murine embryo fibroblasts." *J Cell Physiol* 159(1): 67-75.

Gold, E. J., R. J. Francis, et al. (2003). "Changes in activin and activin receptor subunit expression in rat liver during the development of CCl4-induced cirrhosis." *Mol Cell Endocrinol* 201(1-2): 143-153.

Gold, E. J., X. Zhang, et al. (2005). "betaA- and betaC-activin, follistatin, activin receptor mRNA and betaC-activin peptide expression during rat liver regeneration." *J Mol Endocrinol* 34(2): 505-515.

Gorelik, L. and R. A. Flavell (2002). "Transforming growth factor-beta in T-cell biology." *Nat Rev Immunol* 2(1): 46-53.

Gougos, A. and M. Letarte (1990). "Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells." *J Biol Chem* 265(15): 8361-8364.

Govinden, R. and K. D. Bhoola (2003). "Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta." *Pharmacol Ther* 98(2): 257-265.

Graziadei, I. W., R. H. Wiesner, et al. (1999). "Long-term results of patients undergoing liver transplantation for primary sclerosing cholangitis." *Hepatology* 30(5): 1121-1127.

Gressner, A. M., R. Weiskirchen, et al. (2002). "Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis." *Front Biosci* 7: d793-807.

Gribi, R., T. Tanaka, et al. (2001). "Expression of activin A in inflammatory arthropathies." *Mol Cell Endocrinol* 180(1-2): 163-167.

Groppe, J., J. Greenwald, et al. (2002). "Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin." *Nature* 420(6916): 636-642.

Grusch, M., C. Drucker, et al. (2006). "Deregulation of the activin/follistatin system in hepatocarcinogenesis." *J Hepatol* 45(5): 673-680.

Guo, G. H., D. M. Tan, et al. (2009). "Hepatitis B virus X protein promotes proliferation and upregulates TGF-beta1 and CTGF in human hepatic stellate cell line, LX-2." *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT* 8(1): 59-64.

Guo, J. C., J. F. Bao, et al. (2008). "[Level of serum and liver tissue TGF-beta1 in patients with liver fibrosis due to chronic hepatitis B]." *Zhonghua shi yan he lin chuang bing du xue za zhi = Zhonghua shiyan he linchuang bingduxue zazhi = Chinese journal of experimental and clinical virology* 22(5): 354-357.

Halvorson, L. M. and A. H. DeCherney (1996). "Inhibin, activin, and follistatin in reproductive medicine." *Fertil Steril* 65(3): 459-469.

Hanada, T. and A. Yoshimura (2002). "Regulation of cytokine signaling and inflammation." *Cytokine Growth Factor Rev* 13(4-5): 413-421.

Hangoc, G., C. E. Carow, et al. (1992). "Effects in vivo of recombinant human inhibin on myelopoiesis in mice." *Exp Hematol* 20(10): 1243-1246.

Hardy, C. L., A. E. O'Connor, et al. (2006). "Follistatin is a candidate endogenous negative regulator of activin A in experimental allergic asthma." *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 36(7): 941-950.

Hashimoto, O., N. Kawasaki, et al. (2000). "Difference between follistatin isoforms in the inhibition of activin signalling: activin neutralizing activity of follistatin isoforms is dependent on their affinity for activin." *Cell Signal* 12(8): 565-571.

Hashimoto, O., K. Tsuchida, et al. (2002). "cDNA cloning and expression of human activin betaE subunit." *Mol Cell Endocrinol* 194(1-2): 117-122.

Hata, A., R. S. Lo, et al. (1997). "Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4." *Nature* 388(6637): 82-87.

Hayette, S., M. Gadoux, et al. (1998). "FLRG (follistatin-related gene), a new target of chromosomal rearrangement in malignant blood disorders." *Oncogene* 16(22): 2949-2954.

Hedger, M. P. and L. Clarke (1993). "Isolation of rat blood lymphocytes using a two-step Percoll density gradient. Effect of activin (erythroid differentiation factor) on peripheral T lymphocyte proliferation in vitro." *Journal of immunological methods* 163(1): 133-136.

Hedger, M. P. and L. Clarke (1993). "Isolation of rat blood lymphocytes using a two-step Percoll density gradient. Effect of activin (erythroid differentiation factor) on peripheral T lymphocyte proliferation in vitro." *J Immunol Methods* 163(1): 133-136.

Hedger, M. P., A. E. Drummond, et al. (1989). "Inhibin and activin regulate [3H]thymidine uptake by rat thymocytes and 3T3 cells in vitro." *Molecular and cellular endocrinology* 61(1): 133-138.

Hilden, K., T. Tuuri, et al. (1994). "Expression of type II activin receptor genes during differentiation of human K562 cells and cDNA cloning of the human type IIB activin receptor." *Blood* 83(8): 2163-2170.

Ho, J., C. de Guise, et al. (2004). "Activin induces hepatocyte cell growth arrest through induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B and Sp1." *Cell Signal* 16(6): 693-701.

Huang, X., D. G. Li, et al. (2001). "Expression changes of activin A in the development of hepatic fibrosis." *World J Gastroenterol* 7(1): 37-41.

Hubner, G., M. Brauchle, et al. (1997). "Activin A: a novel player and inflammatory marker in inflammatory bowel disease?" *Lab Invest* 77(4): 311-318.

Hubner, G., Q. Hu, et al. (1996). "Strong induction of activin expression after injury suggests an important role of activin in wound repair." *Dev Biol* 173(2): 490-498.

Hubner, G. and S. Werner (1996). "Serum growth factors and proinflammatory cytokines are potent inducers of activin expression in cultured fibroblasts and keratinocytes." *Exp Cell Res* 228(1): 106-113.

Hughes, P. E., T. Alexi, et al. (1999). "Administration of recombinant human Activin-A has powerful neurotrophic effects on select striatal phenotypes in the quinolinic acid lesion model of Huntington's disease." *Neuroscience* 92(1): 197-209.

Hughes, R. D. and L. W. Evans (2003). "Activin A and follistatin in acute liver failure." *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15(2): 127-131.

Hully, J. R., L. Chang, et al. (1994). "Induction of apoptosis in the murine liver with recombinant human activin A." *Hepatology* 20(4 Pt 1): 854-862.

Hunyady, B., K. Krempels, et al. (1996). "Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining." *J Histochem Cytochem* 44(12): 1353-1362.

Hyttiainen, M., C. Penttinen, et al. (2004). "Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation." *Crit Rev Clin Lab Sci* 41(3): 233-264.

Ishak, K., A. Baptista, et al. (1995). "Histological grading and staging of chronic hepatitis." *J Hepatol* 22(6): 696-699.

Ishisaki, A., K. Yamato, et al. (1999). "Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells." *J Biol Chem* 274(19): 13637-13642.

Jakowlew, S. B., J. E. Mead, et al. (1991). "Transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in rat liver regeneration: messenger RNA expression and activation of latent TGF-beta." *Cell regulation* 2(7): 535-548.

Jimenez, S. A., J. Varga, et al. (1994). "Functional analysis of human alpha 1(I) procollagen gene promoter. Differential activity in collagen-producing and -nonproducing cells and response to transforming growth factor beta 1." *The Journal of biological chemistry* 269(17): 12684-12691.

Jones, K. L., J. N. Brauman, et al. (2000). "Activin A release into the circulation is an early event in systemic inflammation and precedes the release of follistatin." *Endocrinology* 141(5): 1905-1908.

Jones, K. L., D. M. de Kretser, et al. (2004). "Characterisation of the rapid release of activin A following acute lipopolysaccharide challenge in the ewe." *The Journal of endocrinology* 182(1): 69-80.

Jones, K. L., D. M. de Kretser, et al. (2004). "Activin A and follistatin in systemic inflammation." *Mol Cell Endocrinol* 225(1-2): 119-125.

Jones, K. L., A. Mansell, et al. (2007). "Activin A is a critical component of the inflammatory response, and its binding protein, follistatin, reduces mortality in endotoxemia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(41): 16239-16244.

Kanzler, S., A. W. Lohse, et al. (1999). "TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis." *Am J Physiol* 276(4 Pt 1): G1059-1068.

Kanzler, S., C. Weidemann, et al. (1999). "Clinical significance of autoantibodies to soluble liver antigen in autoimmune hepatitis." *J Hepatol* 31(4): 635-640.

Karagiannidis, C., G. Hense, et al. (2006). "Activin A is an acute allergen-responsive cytokine and provides a link to TGF-beta-mediated airway remodeling in asthma." *The Journal of allergy and clinical immunology* 117(1): 111-118.

Kilic, Z. M., S. Ayaz, et al. (2009). "Plasma transforming growth factor-beta1 level in inflammatory bowel disease." *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology* 20(3): 165-170.

Kingsley, D. M. (1994). "The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms." *Genes Dev* 8(2): 133-146.

Kirmaz, C., E. Terzioglu, et al. (2004). "Serum transforming growth factor-beta1(TGF-beta1) in patients with cirrhosis, chronic hepatitis B and chronic hepatitis C [corrected]." *European cytokine network* 15(2): 112-116.

Klein, R., I. J. Clarke, et al. (1996). "Plasma follistatin concentrations increase following lipopolysaccharide administration in sheep." *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 23(8): 754-755.

Kogure, K., W. Omata, et al. (1995). "A single intraportal administration of follistatin accelerates liver regeneration in partially hepatectomized rats." *Gastroenterology* 108(4): 1136-1142.

Kogure, K., Y. Q. Zhang, et al. (1996). "Intravenous administration of follistatin: delivery to the liver and effect on liver regeneration after partial hepatectomy." *Hepatology* 24(2): 361-366.

Kulkarni, A. B., C. G. Huh, et al. (1993). "Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(2): 770-774.

Lau, A. L., T. R. Kumar, et al. (2000). "Activin betaC and betaE genes are not essential for mouse liver growth, differentiation, and regeneration." *Mol Cell Biol* 20(16): 6127-6137.

Letterio, J. J., A. G. Geiser, et al. (1994). "Maternal rescue of transforming growth factor-beta 1 null mice." *Science* 264(5167): 1936-1938.

Lewis, K. A., P. C. Gray, et al. (2000). "Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling." *Nature* 404(6776): 411-414.

Li, S., Y. L. Ouyang, et al. (1997). "Superinduction of IL-2 gene expression by vomitoxin (deoxynivalenol) involves increased mRNA stability." *Toxicol Appl Pharmacol* 147(2): 331-342.

Lin, H. Y. and A. Moustakas (1994). "TGF-beta receptors: structure and function." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 40(3): 337-349.

Lin, S. D., T. Kawakami, et al. (2006). "Ratio of circulating follistatin and activin A reflects the severity of acute liver injury and prognosis in patients with acute liver failure." *J Gastroenterol Hepatol* 21(2): 374-380.

Lindor, K. D. (1997). "Ursodiol for primary sclerosing cholangitis. Mayo Primary Sclerosing Cholangitis-Ursodeoxycholic Acid Study Group." *N Engl J Med* 336(10): 691-695.

Lindor, K. D., R. H. Wiesner, et al. (1991). "The combination of prednisone and colchicine in patients with primary sclerosing cholangitis." *Am J Gastroenterol* 86(1): 57-61.

Ling, N., S. Y. Ying, et al. (1986). "A homodimer of the beta-subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle stimulating hormone." *Biochem Biophys Res Commun* 138(3): 1129-1137.

Ling, N., S. Y. Ying, et al. (1986). "Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin." *Nature* 321(6072): 779-782.

Liu, F., C. Pouponnot, et al. (1997). "Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes." *Genes Dev* 11(23): 3157-3167.

Lohse, A. W., M. Kogel, et al. (1995). "Evidence for spontaneous immunosuppression in autoimmune hepatitis." *Hepatology* 22(2): 381-388.

Loria, P., F. Petraglia, et al. (1998). "Influence of age and sex on serum concentrations of total dimeric activin A." *Eur J Endocrinol* 139(5): 487-492.

Ludwig, J., S. S. Barham, et al. (1981). "Morphologic features of chronic hepatitis associated with primary sclerosing cholangitis and chronic ulcerative colitis." *Hepatology* 1(6): 632-640.

Luisi, S., P. Florio, et al. (2001). "Expression and secretion of activin A: possible physiological and clinical implications." *Eur J Endocrinol* 145(3): 225-236.

Manns, M. P. and A. Vogel (2006). "Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy." *Hepatology* 43(2 Suppl 1): S132-144.

Massague, J. and Y. G. Chen (2000). "Controlling TGF-beta signaling." *Genes Dev* 14(6): 627-644.

Massague, J., J. Seoane, et al. (2005). "Smad transcription factors." *Genes Dev* 19(23): 2783-2810.

Mather, J. P., P. E. Roberts, et al. (1993). "Follistatin modulates activin activity in a cell- and tissue-specific manner." *Endocrinology* 132(6): 2732-2734.

Mathews, L. S. and W. W. Vale (1993). "Molecular and functional characterization of activin receptors." *Receptor* 3(3): 173-181.

Matsuse, T., Y. Fukuchi, et al. (1995). "Expression of immunoreactive and bioactive activin A protein in adult murine lung after bleomycin treatment." *American journal of respiratory cell and molecular biology* 13(1): 17-24.

Matsuse, T., A. Ikegami, et al. (1996). "Expression of immunoreactive activin A protein in remodeling lesions associated with interstitial pulmonary fibrosis." *Am J Pathol* 148(3): 707-713.

Matzuk, M. M., T. R. Kumar, et al. (1995). "Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II." *Nature* 374(6520): 356-360.

Matzuk, M. M., T. R. Kumar, et al. (1995). "Functional analysis of activins during mammalian development." *Nature* 374(6520): 354-356.

McCullagh, D. R. (1932). "Dual Endocrine Activity of the Testes." *Science* 76(1957): 19-20.

McFarlane, I. G. (2002). "Autoimmune hepatitis: diagnostic criteria, subclassifications, and clinical features." *Clin Liver Dis* 6(3): 605-621.

Mellor, S. L., M. Cranfield, et al. (2000). "Localization of activin beta(A)-, beta(B)-, and beta(C)-subunits in human prostate and evidence for formation of new activin heterodimers of beta(C)-subunit." *J Clin Endocrinol Metab* 85(12): 4851-4858.

Miao, W. M., W. L. Seng, et al. (2001). "Thrombospondin-1 type 1 repeat recombinant proteins inhibit tumor growth through transforming growth factor-beta-dependent and -independent mechanisms." *Cancer Res* 61(21): 7830-7839.

Michel, U., S. Ebert, et al. (2000). "Follistatin (FS) in human cerebrospinal fluid and regulation of FS expression in a mouse model of meningitis." *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 143(6): 809-816.

Michel, U., S. Ebert, et al. (2000). "Follistatin (FS) in human cerebrospinal fluid and regulation of FS expression in a mouse model of meningitis." *Eur J Endocrinol* 143(6): 809-816.

Michel, U., O. Schneider, et al. (1996). "Production of follistatin in porcine endothelial cells: differential regulation by bacterial compounds and the synthetic glucocorticoid RU 28362." *Endocrinology* 137(11): 4925-4934.

Mirmonsef, P., C. P. Shelburne, et al. (1999). "Inhibition of Kit expression by IL-4 and IL-10 in murine mast cells: role of STAT6 and phosphatidylinositol 3'-kinase." *J Immunol* 163(5): 2530-2539.

- Miyazono, K. (1997). "TGF-beta receptors and signal transduction." *Int J Hematol* 65(2): 97-104.
- Morais, C. N., M. Carvalho Bde, et al. (2010). "Correlation of biological serum markers with the degree of hepatic fibrosis and necroinflammatory activity in hepatitis C and schistosomiasis patients." *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 105(4): 460-466.
- Munz, B., G. Hubner, et al. (1999). "A novel role of activin in inflammation and repair." *J Endocrinol* 161(2): 187-193.
- Munz, B., Y. P. Tretter, et al. (2001). "The roles of activins in repair processes of the skin and the brain." *Mol Cell Endocrinol* 180(1-2): 169-177.
- Muttukrishna, S., T. Child, et al. (2000). "Serum concentrations of dimeric inhibins, activin A, gonadotrophins and ovarian steroids during the menstrual cycle in older women." *Hum Reprod* 15(3): 549-556.
- Nakao, A., T. Imamura, et al. (1997). "TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4." *Embo J* 16(17): 5353-5362.
- Noble, N. A., J. R. Harper, et al. (1992). "In vivo interactions of TGF-beta and extracellular matrix." *Progress in growth factor research* 4(4): 369-382.
- Nusing, R. M. and J. Barsig (1999). "Induction of prostanoid, nitric oxide, and cytokine formation in rat bone marrow derived macrophages by activin A." *Br J Pharmacol* 127(4): 919-926.
- Oberhammer, F., W. Bursch, et al. (1991). "Effect of transforming growth factor beta on cell death of cultured rat hepatocytes." *Cancer Res* 51(9): 2478-2485.
- Obermayer-Straub, P., C. P. Strassburg, et al. (2000). "Autoimmune hepatitis." *J Hepatol* 32(1 Suppl): 181-197.
- Oda, S., S. Nishimatsu, et al. (1995). "Molecular cloning and functional analysis of a new activin beta subunit: a dorsal mesoderm-inducing activity in *Xenopus*." *Biochem Biophys Res Commun* 210(2): 581-588.
- Ogawa, K., M. Funaba, et al. (2006). "Activin A functions as a Th2 cytokine in the promotion of the alternative activation of macrophages." *J Immunol* 177(10): 6787-6794.
- Ogawa, K., M. Funaba, et al. (2006). "Activin A functions as a Th2 cytokine in the promotion of the alternative activation of macrophages." *Journal of immunology* 177(10): 6787-6794.
- Ogawa, K., M. Funaba, et al. (2000). "Activin A stimulates type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2) production in mouse peritoneal macrophages." *J Immunol* 165(6): 2997-3003.
- Ohga, E., T. Matsuse, et al. (1996). "Effects of activin A on proliferation and differentiation of human lung fibroblasts." *Biochem Biophys Res Commun* 228(2): 391-396.

Ohnishi, N., T. Miyata, et al. (2003). "Activin A is an autocrine activator of rat pancreatic stellate cells: potential therapeutic role of follistatin for pancreatic fibrosis." *Gut* 52(10): 1487-1493.

Onichtchouk, D., Y. G. Chen, et al. (1999). "Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI." *Nature* 401(6752): 480-485.

Padgett, R. W., C. Savage, et al. (1997). "Genetic and biochemical analysis of TGF beta signal transduction." *Cytokine Growth Factor Rev* 8(1): 1-9.

Patella, S., D. J. Phillips, et al. (2001). "Characterization of serum activin-A and follistatin and their relation to virological and histological determinants in chronic viral hepatitis." *J Hepatol* 34(4): 576-583.

Patella, S., D. J. Phillips, et al. (2006). "Follistatin attenuates early liver fibrosis: effects on hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(1): G137-144.

Phillips, D. J., K. L. Jones, et al. (2001). "Evidence for activin A and follistatin involvement in the systemic inflammatory response." *Mol Cell Endocrinol* 180(1-2): 155-162.

Pittelkow, M. R. (1992). "Growth factors in cutaneous biology and disease." *Adv Dermatol* 7: 55-81; discussion 82.

Ponsioen, C. I. and G. N. Tytgat (1998). "Primary sclerosing cholangitis: a clinical review." *Am J Gastroenterol* 93(4): 515-523.

Poupon, R., O. Chazouilleres, et al. (2000). "Chronic cholestatic diseases." *J Hepatol* 32(1 Suppl): 129-140.

Pouponnot, C., L. Jayaraman, et al. (1998). "Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP." *J Biol Chem* 273(36): 22865-22868.

Qi, Z., N. Atsuchi, et al. (1999). "Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5): 2345-2349.

Rallon, N. I., P. Barreiro, et al. (2011). "Elevated TGF-beta1 levels might protect HCV/ HIV-coinfected patients from liver fibrosis." *European journal of clinical investigation* 41(1): 70-76.

Reeves, H. L. and S. L. Friedman (2002). "Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis." *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 7: d808-826.

Roberts, A. B. (1998). "Molecular and cell biology of TGF-beta." *Mineral and electrolyte metabolism* 24(2-3): 111-119.

Roberts, A. B., M. A. Anzano, et al. (1985). "Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(1): 119-123.

Roberts, A. B. and M. B. Sporn (1993). "Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta)." *Growth factors* 8(1): 1-9.

Robson, N. C., H. Wei, et al. (2009). "Activin-A attenuates several human natural killer cell functions." *Blood* 113(14): 3218-3225.

Rodgarkia-Dara, C., S. Vejda, et al. (2006). "The activin axis in liver biology and disease." *Mutat Res* 613(2-3): 123-137.

Rotzer, D., M. Roth, et al. (2001). "Type III TGF-beta receptor-independent signalling of TGF-beta2 via TbetaRII-B, an alternatively spliced TGF-beta type II receptor." *Embo J* 20(3): 480-490.

Saiki, R. K., S. Scharf, et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* 230(4732): 1350-1354.

Sakaguchi, K., M. Kitano, et al. (2004). "Serum level of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and the expression of TGF-beta receptor type II in peripheral blood mononuclear cells in patients with autoimmune hepatitis." *Hepato-gastroenterology* 51(60): 1780-1783.

Sakai, R. and Y. Eto (2001). "Involvement of activin in the regulation of bone metabolism." *Mol Cell Endocrinol* 180(1-2): 183-188.

Sakurai, T., Y. Abe, et al. (1994). "Activin A stimulates mitogenesis in Swiss 3T3 fibroblasts without activation of mitogen-activated protein kinases." *J Biol Chem* 269(19): 14118-14122.

Sanderson, N., V. Factor, et al. (1995). "Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(7): 2572-2576.

Sato, M., Y. Muragaki, et al. (2003). "Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction." *The Journal of clinical investigation* 112(10): 1486-1494.

Schiller, M., D. Javelaud, et al. (2004). "TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing." *Journal of dermatological science* 35(2): 83-92.

Schmitt, J., G. Hotten, et al. (1996). "Structure, chromosomal localization, and expression analysis of the mouse inhibin/activin beta C (Inhbc) gene." *Genomics* 32(3): 358-366.

Schneyer, A., A. Schoen, et al. (2003). "Differential binding and neutralization of activins A and B by follistatin and follistatin like-3 (FSTL-3/FSRP/FLRG)." *Endocrinology* 144(5): 1671-1674.

Schneyer, A. L., D. A. Rzucidlo, et al. (1994). "Characterization of unique binding kinetics of follistatin and activin or inhibin in serum." *Endocrinology* 135(2): 667-674.

Schneyer, A. L., Q. Wang, et al. (2004). "Differential distribution of follistatin isoforms: application of a new FS315-specific immunoassay." *J Clin Endocrinol Metab* 89(10): 5067-5075.

Schramm, C. and A. W. Lohse (2005). "Overlap syndromes of cholestatic liver diseases and auto-immune hepatitis." *Clin Rev Allergy Immunol* 28(2): 105-114.

Schwall, R. H., K. Nikolics, et al. (1988). "Recombinant expression and characterization of human activin A." *Mol Endocrinol* 2(12): 1237-1242.

Schwall, R. H., K. Robbins, et al. (1993). "Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro." *Hepatology* 18(2): 347-356.

Shao, L., N. L. Frigon, Jr., et al. (1992). "Regulation of production of activin A in human marrow stromal cells and monocytes." *Exp Hematol* 20(10): 1235-1242.

Shi, Y., A. Hata, et al. (1997). "A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4." *Nature* 388(6637): 87-93.

Shimasaki, S., M. Koga, et al. (1988). "Porcine follistatin gene structure supports two forms of mature follistatin produced by alternative splicing." *Biochem Biophys Res Commun* 152(2): 717-723.

Shimonaka, M., S. Inouye, et al. (1991). "Follistatin binds to both activin and inhibin through the common subunit." *Endocrinology* 128(6): 3313-3315.

Shirai, Y., S. Kawata, et al. (1994). "Plasma transforming growth factor-beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma. Comparison with chronic liver diseases." *Cancer* 73(9): 2275-2279.

Shull, M. M., I. Ormsby, et al. (1992). "Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease." *Nature* 359(6397): 693-699.

Sidis, Y., D. V. Tortoriello, et al. (2002). "Follistatin-related protein and follistatin differentially neutralize endogenous vs. exogenous activin." *Endocrinology* 143(5): 1613-1624.

Sporn, M. B. (1999). "TGF-beta: 20 years and counting." *Microbes Infect* 1(15): 1251-1253.

Spurkland, A., S. Saarinen, et al. (1999). "HLA class II haplotypes in primary sclerosing cholangitis patients from five European populations." *Tissue Antigens* 53(5): 459-469.

Sternberg, D., J. Honigwachs-sha'anani, et al. (1995). "Restrictin-P/stromal activin A, kills its target cells via an apoptotic mechanism." *Growth Factors* 12(4): 277-287.

Stover, D. G., B. Bierie, et al. (2007). "A delicate balance: TGF-beta and the tumor microenvironment." *J Cell Biochem* 101(4): 851-861.

Sugiyama, M., T. Ichida, et al. (1998). "Expression of activin A is increased in cirrhotic and fibrotic rat livers." *Gastroenterology* 114(3): 550-558.

Takabe, K., L. Wang, et al. (2003). "Adenovirus-mediated overexpression of follistatin enlarges intact liver of adult rats." *Hepatology* 38(5): 1107-1115.

Tanimoto, Y., K. Tanimoto, et al. (1999). "Male sterility in transgenic mice expressing activin betaA subunit gene in testis." *Biochem Biophys Res Commun* 259(3): 699-705.

Tarantino, G., P. Conca, et al. (2008). "Enhanced serum concentrations of transforming growth factor-beta1 in simple fatty liver: is it really benign?" *Journal of translational medicine* 6: 72.

Thomsen, G. H. (1997). "Antagonism within and around the organizer: BMP inhibitors in vertebrate body patterning." *Trends in genetics : TIG* 13(6): 209-211.

Tsukazaki, T., T. A. Chiang, et al. (1998). "SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor." *Cell* 95(6): 779-791.

Tucker, R. F., E. L. Branum, et al. (1984). "Specific binding to cultured cells of 125I-labeled type beta transforming growth factor from human platelets." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(21): 6757-6761.

Ueno, N., S. Nishimatsu, et al. (1990). "Activin as a cell differentiation factor." *Prog Growth Factor Res* 2(2): 113-124.

Uitto, J. and D. Kouba (2000). "Cytokine modulation of extracellular matrix gene expression: relevance to fibrotic skin diseases." *Journal of dermatological science* 24 Suppl 1: S60-69.

Vale, W., C. Rivier, et al. (1988). "Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones." *Recent Prog Horm Res* 44: 1-34.

van Milligen de Wit, A. W., S. J. van Deventer, et al. (1995). "Immunogenetic aspects of primary sclerosing cholangitis: implications for therapeutic strategies." *Am J Gastroenterol* 90(6): 893-900.

Vaughan, J. M. and W. W. Vale (1993). "Alpha 2-macroglobulin is a binding protein of inhibin and activin." *Endocrinology* 132(5): 2038-2050.

Vejda, S., M. Cranfield, et al. (2002). "Expression and dimerization of the rat activin subunits betaC and betaE: evidence for the oramation of novel activin dimers." *J Mol Endocrinol* 28(2): 137-148.

Vejda, S., N. Erlach, et al. (2003). "Expression of activins C and E induces apoptosis in human and rat hepatoma cells." *Carcinogenesis* 24(11): 1801-1809.

Veldhoen, M., R. J. Hocking, et al. (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." *Immunity* 24(2): 179-189.

Verrecchia, F. and A. Mauviel (2002). "Control of connective tissue gene expression by TGF beta: role of Smad proteins in fibrosis." *Current rheumatology reports* 4(2): 143-149.

Verrecchia, F. and A. Mauviel (2007). "Transforming growth factor-beta and fibrosis." *World journal of gastroenterology : WJG* 13(22): 3056-3062.

Vodovotz, Y., C. Bogdan, et al. (1993). "Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta." *J Exp Med* 178(2): 605-613.

Vojdani, A. and J. Erde (2006). "Regulatory T Cells, a Potent Immunoregulatory Target for CAM Researchers: Modulating Allergic and Infectious Disease Pathology (II)." *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 3(2): 209-215.

Wakefield, L. M., D. M. Smith, et al. (1988). "Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences." *J Biol Chem* 263(16): 7646-7654.

Wankell, M., B. Munz, et al. (2001). "Impaired wound healing in transgenic mice overexpressing the activin antagonist follistatin in the epidermis." *Embo J* 20(19): 5361-5372.

Wanninger, J., R. Wiest, et al. (2011). "Portal levels of latent transforming growth factor-beta are related to liver function in patients with liver cirrhosis." *European journal of gastroenterology & hepatology* 23(3): 218-223.

Werner, S. and C. Alzheimer (2006). "Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease." *Cytokine & growth factor reviews* 17(3): 157-171.

Werner, S. and C. Alzheimer (2006). "Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease." *Cytokine Growth Factor Rev* 17(3): 157-171.

Wiesner, R. H., P. M. Grambsch, et al. (1989). "Primary sclerosing cholangitis: natural history, prognostic factors and survival analysis." *Hepatology* 10(4): 430-436.

Wiesner, R. H. and N. F. LaRusso (1980). "Clinicopathologic features of the syndrome of primary sclerosing cholangitis." *Gastroenterology* 79(2): 200-206.

Woodruff, T. K. (1998). "Regulation of cellular and system function by activin." *Biochem Pharmacol* 55(7): 953-963.

Woodruff, T. K., L. Krummen, et al. (1993). "In situ ligand binding of recombinant human [125I] activin-A and recombinant human [125I]inhibin-A to the adult rat ovary." *Endocrinology* 133(6): 2998-3006.

Wu, D. D., M. Lai, et al. (1999). "Expression of the activin axis and neuronal rescue effects of recombinant activin A following hypoxic-ischemic brain injury in the infant rat." *Brain Res* 835(2): 369-378.

Wu, R. Y., Y. Zhang, et al. (1997). "Heteromeric and homomeric interactions correlate with signaling activity and functional cooperativity of Smad3 and Smad4/DPC4." *Mol Cell Biol* 17(5): 2521-2528.

Yamashita, N., T. Nakajima, et al. (1993). "Effects of activin A on IgE synthesis and cytokine production by human peripheral mononuclear cells." *Clin Exp Immunol* 94(1): 214-219.

- Yamashita, S., A. Maeshima, et al. (2004). "Activin A is a potent activator of renal interstitial fibroblasts." *J Am Soc Nephrol* 15(1): 91-101.
- Yang, Y. A., O. Dukhanina, et al. (2002). "Lifetime exposure to a soluble TGF-beta antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects." *J Clin Invest* 109(12): 1607-1615.
- Yasuda, H., T. Mine, et al. (1993). "Activin A: an autocrine inhibitor of initiation of DNA synthesis in rat hepatocytes." *J Clin Invest* 92(3): 1491-1496.
- Ying, S. Y. (1987). "Inhibins and activins: chemical properties and biological activity." *Proc Soc Exp Biol Med* 186(3): 253-264.
- Yndestad, A., J. W. Haukeland, et al. (2009). "A complex role of activin A in non-alcoholic fatty liver disease." *Am J Gastroenterol* 104(9): 2196-2205.
- Young, G. D. and J. E. Murphy-Ullrich (2004). "Molecular interactions that confer latency to transforming growth factor-beta." *J Biol Chem* 279(36): 38032-38039.
- Yu, E. W., K. E. Dolter, et al. (1998). "Suppression of IL-6 biological activities by activin A and implications for inflammatory arthropathies." *Clin Exp Immunol* 112(1): 126-132.
- Yu, E. W., K. E. Dolter, et al. (1998). "Suppression of IL-6 biological activities by activin A and implications for inflammatory arthropathies." *Clinical and experimental immunology* 112(1): 126-132.
- Yu, J., L. E. Shao, et al. (1996). "Induced expression of the new cytokine, activin A, in human monocytes: inhibition by glucocorticoids and retinoic acid." *Immunology* 88(3): 368-374.
- Yuan, W. and J. Varga (2001). "Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3." *The Journal of biological chemistry* 276(42): 38502-38510.
- Yuen, M. F., S. Norris, et al. (2002). "Transforming growth factor-beta 1, activin and follistatin in patients with hepatocellular carcinoma and patients with alcoholic cirrhosis." *Scand J Gastroenterol* 37(2): 233-238.
- Zauberman, A., M. Oren, et al. (1997). "Involvement of p21(WAF1/Cip1), CDK4 and Rb in activin A mediated signaling leading to hepatoma cell growth inhibition." *Oncogene* 15(14): 1705-1711.
- Zenewicz, L. A., G. D. Yancopoulos, et al. (2008). "Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease." *Immunity* 29(6): 947-957.
- Zhang, Y. Q., M. Kanzaki, et al. (1997). "Regulation of the expression of follistatin in rat hepatocytes." *Biochim Biophys Acta* 1354(3): 204-210.

Zhumabekov, T., P. Corbella, et al. (1995). "Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice." *J Immunol Methods* 185(1): 133-140.

Zipori, D. and M. Barda-Saad (2001). "Role of activin A in negative regulation of normal and tumor B lymphocytes." *Journal of leukocyte biology* 69(6): 867-873.

## 11. Danksagung

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Labores Blessing bedanken, insbesondere bei Professor Dr. Manfred Blessing, für die Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Ich möchte mich außerdem bei Herrn Prof. Dr. Lohse und seinen Mitarbeitern und Frau Dr. Sabine Werner für die Unterstützung bedanken.

## **12. Lebenslauf**

(entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen)



### **13. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....