

Mechanismus der Hemmung der glucagon-stimulierten
Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-1-Genexpression durch das
proinflammatorische Cytokin Interleukin 6 in primär kultivierten
Rattenhepatozyten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Meike Quaas
aus Bremerhaven

Göttingen 2000

D7

Referent: Prof. Dr. Kurt Jungermann

Korreferent: Prof. Dr. Rüdiger Hardeland

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Oktober 2000

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	V
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	VII
Zusammenfassung.....	1
1. Einleitung	3
1.1 Funktionen der Leber	3
1.1.1 Regulation der Glucose-Homöostase	3
1.1.2 Regulation der PCK1-Genexpression durch Hormone	4
1.2 Interleukin 6 und die Akut-Phase-Reaktion	5
1.2.1 Regulation der Glucose-Homöostase in der Akut-Phase-Reaktion	7
1.2.2 Regulation der PCK1-Genexpression durch Cytokine	7
1.3 Aufgabenstellung	8
2. MATERIAL	9
2.1 Tiere und Tierhaltung.....	9
2.2 Bakterien, Vektoren und Plasmidkonstrukte.....	9
2.2.1 Bakterien.....	9
2.2.2 Vektoren.....	9
2.3. Oligonukleotide	13
2.3.1 Oligonukleotide zur Generierung unterschiedlicher PCK1-Promotorfragmente... 13	
2.3.2 Oligonukleotide für PCR und die Sequenzierung der Plasmide..... 14	
2.4 Enzyme	14
2.5 Nachweis-, Reinigungs- und Synthesesysteme ("Kits").....	16
2.6 Stammlösungen.....	17
2.7 Chemikalien.....	19
2.8 Sonstige Materialien.....	20
2.9 Geräte	21
3. METHODEN	24
3.1 Zellbiologische Methoden.....	24
3.1.1 Isolierung von Rattenhepatozyten..... 24	
<i>Perfusion der Leber</i>	<i>24</i>
<i>Herstellung der Hepatozytensuspension</i>	<i>24</i>
3.1.2 Primärkultur von Rattenhepatozyten	26
3.2 Molekularbiologische Methoden	30
3.2.1 Agarosegelelektrophorese	30

3.2.2	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	31
3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion	32
3.2.4	Überlappende Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
3.2.5	Reinigung von PCR-Produkten.....	36
3.2.6	Klonierung der PCR-Fragmente in ein Reporter-Plasmid.....	36
	<i>Ligation der PCR-Fragmente in das Luciferase-Reporter-Gen-Plasmid</i>	
	<i>pGL3-Basic</i>	36
	<i>Herstellung elektrokompeter E. coli XL1</i>	38
	<i>Herstellung chemischkompetenter E. coli DH5a</i>	39
	<i>Transformation von E. coli XL1 und E. coli DH5a</i>	39
3.2.7	Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA	41
	<i>Schnelle Minipräparation von Plasmid-DNA für die Überprüfung</i>	
	<i>des Klonierungserfolgs durch PCR</i>	41
	<i>Minipräparation nach QIAGEN für die Überprüfung des Klonierungserfolgs</i>	
	<i>durch Sequenzierung und Restriktionsverdau</i>	42
	<i>Isolierung von Plasmid-DNA (Maxipräparation)</i>	42
3.2.8	Sequenzierung klonierter Fragmente	44
3.2.9	Transfektion von Hepatozyten	46
3.2.10	Herstellung der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden	47
	<i>Transkription von pBS-cDNA mit Digoxigenin-UTP</i>	47
	<i>Linearisierung des Plasmides pBS-PCK1.2</i>	48
	<i>In vitro-Transkription</i>	48
	<i>Überprüfung der Markierungseffizienz</i>	49
3.2.11	RNA-Isolierung aus primär kultivierten Rattenhepatozyten.....	50
3.2.12	Quantifizierung von mRNA durch Northern Blot Analyse.....	52
	<i>Denaturierung der RNA</i>	52
	<i>Elektrophoresebedingungen</i>	53
	<i>Visualisierung der RNA mit Ethidiumbromid</i>	54
	<i>Transfer der RNA auf Nylonmembran</i>	54
	<i>Hybridisierung der RNA mit einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde</i>	55
	<i>Detektion und Quantifizierung</i>	55
3.3	Biochemische Methoden	57
3.3.1	Isolierte Leberperfusion.....	57
3.3.2	Enzymatische Glucosebestimmung im Perfusat.....	59
3.3.3	Bestimmung der Substratbilanz der Leber.....	60
3.3.4	Glucose-Bestimmung im Medium kultivierter Hepatozyten.....	61
3.3.5	Bestimmung der cAMP-Konzentrationen	61
3.3.6	Membranpräparation.....	62
3.3.7	Kompetitiver Bindungsassay	63

3.3.8	Proteinbestimmung.....	64
3.3.9	Luciferase-Nachweis	64
3.4	Sicherheitsmaßnahmen.....	65
4.	ERGEBNISSE.....	66
4.1	Hemmung der zellulären Glucagonwirkungskette durch Interleukin 6.....	66
4.1.1	Hemmung der glucagon-stimulierten PCK1-Genexpression durch IL6 in kultivierten Rattenhepatozyten.....	66
4.1.2	Hemmung der glucagon-stimulierten cAMP-Bildung durch IL6 in kultivierten Rattenhepatozyten.....	69
4.1.3	Hemmung der glucagon-stimulierten Glucose-Freisetzung durch IL6 in kultivierten Rattenhepatozyten.....	71
4.1.4	Hemmung der glucagon-stimulierten Glucose-Freisetzung durch IL6 in der isolierten, nicht-rezirkulierend perfundierten Rattenleber	74
4.1.5	Etablierung eines Bindungsassays für den Glucagon-Rezeptor in primär kultivierten Rattenhepatozyten.....	77
4.1.6	Transiente Verminderung der J ¹²⁵ -Glucagonbindung an den Glucagon-Rezeptor durch IL6 in kultivierten Rattenhepatozyten	79
4.1.7	Steigerung der Affinität des Glucagon-Rezeptors aus kultivierten Rattenhepatozyten zum Liganden durch IL6.....	80
4.2	Regulation des Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-1-Gen-Promotors durch Interleukin 6	83
4.2.1	Stimulation der Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle der Promotoren PCKprom-979/+32, PCKprom-1149/+32 und PCKprom-2500/+32 durch Glucagon; Einfluß von IL6	83
4.2.2	Stimulation der Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle der Promotoren PCKprom-979/+32, PCKprom-1149/+32 und PCKprom-2500/+32 durch CPT-cAMP; Einfluß von IL6	85
4.2.3	Stimulation der Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle der Promotoren PCKprom-1038/+32 und PCKprom-1068/+32 durch CPT-cAMP; Einfluß von IL6	88
4.2.4	Stimulation der Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle des mutierten PCK1-Genpromotors PCKprom-1149/+32mut durch CPT-cAMP; Einfluß von IL6	89
4.2.5	Vergleich der Stimulierbarkeit aller untersuchten PCK1-Promotoren durch CPT-cAMP und IL6	92
5.	Diskussion.....	95
5.1	Hemmung der Glucagon-Wirkung durch IL6 auf der Ebene des Glucagon-Rezeptors.....	96
5.1.1	Hemmung der glucagon-stimulierten, nicht aber der isoproterenol-stimulierten cAMP-vermittelten Glucose-Freisetzung durch IL6 auf einer Ebene vor der cAMP-Bildung.....	96
5.1.2	Hemmung der glucagon-stimulierten cAMP-Bildung durch IL6 auf der Ebene der Kopplung des Glucagon-Rezeptors am Gs	97

5.1.3	Hemmung der Signaltransduktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) bei Erhöhung der Ligandenaffinität	98
5.1.4	Modell der IL6-induzierten Desensitivierung des Glucagon-Rezeptors	100
5.2	Hemmung der Glucagon-Wirkung durch IL6 auf der Ebene des Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-1-Gens	103
5.2.1	Regulation der PCK1-Genexpression durch Transkriptionsfaktoren	103
5.2.2	Regulation der Genexpression durch IL6	104
5.2.3	CCAAT/Enhancer-Binding Proteine (C/EBP) – mögliches Bindeglied zwischen IL6- und Glucagon-regulierter Genexpression.....	106
	<i>C/EBP-Familie</i>	<i>106</i>
	<i>C/EBP-Transkriptionsfaktoren und PCK1-Genexpression</i>	<i>107</i>
	<i>C/EBPb: Mediator der IL6-induzierten Signaltransduktion.....</i>	<i>107</i>
	<i>Defekte der Regulation der Glucose-Homöostase in C/EBP-Knockout Mäusen</i>	<i>108</i>
5.2.4	Mechanismus der Verstärkung der cAMP-stimulierten Aktivierung des PCK1-Promotors durch IL6 in den Luciferase-Reportergen Promotoren PCKprom-979/+32 und PCKprom-1038/+32.....	108
5.2.5	Mechanismus der Aufhebung der Verstärkung der cAMP-stimulierten Aktivierung des PCK1-Promotors durch IL6 in den Luciferase-Reportergen Promotoren PCKprom-1068/+32, PCKprom-1149/+32 und PCKprom-2500/+32.....	109
5.3	Bedeutung des IL6-Glucagon-Antagonismus für die Pathogenese der Hypoglykämie im septischen Schock.....	111
5.4	Ausblick.....	112
	Literaturverzeichnis.....	113

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin)
cAMP	cyclisches Adenosinphosphat
cDNA	komplementäre DNA
C/EBP	Caat Verstärker Bindungsprotein (CAAT enhancer binding protein)
cpm	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CPT-cAMP	Chlorphenylthio-cAMP
CRE	cAMP responsives Element
CREB	CRE-Bindungsprotein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ΔE	Extinktionsdifferenz
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycolaminoethylethertetraacetat
FCS	Fötale Kälberserum (Fetal calf serum)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
Ggn	Glucagon
G-Protein	Guanin-Nukleotid bindendes Protein
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren (G-protein coupled receptor)
G _s	stimulatorisches G-Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazinyl)-1-Ethansulfonat

IBMX	Isobutylmethylxanthin
Iso	Isoproterenol
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
Luc	Luciferase
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NBT	Nitroblautetrazolium-Salz
Od _{xy nm}	Absorption (Optische Dichte) bei einer Wellenlänge von xy nm
p	Plasmid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline)
PCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIA	Radio Immunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (Sodium Dodecylsulfat)
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat (Standard saline citrate)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure (Trichloroaceticacid)
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	enzymatische Aktivität (Units)
UV	Ultraviolett
VCI	Vena cava inferior
VP	Vena portae
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1:	Die regulatorische Region des Promotors des cytosolischen PCK1-Gens mit den dazugehörigen möglichen Bindungsproteinen.....	5
Abb. 2:	Stimulation der Akut-Phase-Protein-Genexpression durch proinflammatorische Cytokine	6
Abb. 3:	Aufbau des Bluescript-Vektors (pBS)	10
Abb. 4:	Aufbau des pGL3basic-Vektors	11
Abb. 5:	Luciferase-Genkonstrukte mit verschiedenen Fragmenten des PCK1-Promotors	12
Abb. 6:	Schematische Darstellung der überlappenden Polymerase-Kettenreaktion ...	35
Abb. 7:	Prinzip der kohäsiven Klonierung.....	37
Abb. 8	Prinzip des Northern Blots	52
Abb. 9:	Aufbau eines Kapillar Northern Blots	54
Abb. 10:	Schema der isolierten Leberperfusion.....	57
Abb. 11:	Hemmung des (A) glucagon- und des (B) isoproterenol-stimulierten PCK1-mRNA-Anstiegs durch IL6 in primär kultivierten Rattenhepatozyten.....	68
Abb. 12:	Hemmung des glucagon-stimulierten cAMP-Anstiegs durch IL6 (A), nicht aber des isoproterenol-stimulierten cAMP-Anstiegs (B) in primär kultivierten Rattenhepatozyten	70
Abb. 13:	Stimulation der cAMP-Bildung durch Glucagon (A) und Isoproterenol (B) in An- und Abwesenheit von IL6 in primär kultivierten Rattenhepatozyten.....	71
Abb. 14:	Hemmung der glucagon-stimulierten Glucose-Freisetzung durch IL6 (A), nicht aber der isoproterenol-stimulierten Glucose-Freisetzung (B) in primär kultivierten Rattenhepatozyten	73
Abb. 15:	Stimulation der Glucose-Freisetzung durch Glucagon (A) und Isoproterenol (B) in An- und Abwesenheit von IL6 in primär kultivierten Rattenhepatozyten	74
Abb. 16:	Hemmung der glucagon-, nicht aber der isoproterenol-stimulierten Glucose-Bildung durch IL6 in der isoliert perfundierten Rattenleber	76
Abb. 17:	Bindung von J ¹²⁵ -Glucagon an den Glucagon-Rezeptor in Abhängigkeit von der eingesetzten Gesamtproteinmenge.....	78
Abb. 18:	Transiente Verminderung der Bindung von J ¹²⁵ -Glucagon an Membranen aus kultivierten Rattenhepatozyten durch IL6	80
Abb. 19:	Steigerung der Affinität von Glucagon zum Rezeptor an Membranen aus primär kultivierten Rattenhepatozyten durch IL6.....	82
Abb. 20:	Stimulation der Luciferase-Genexpression unter der Kontrolle der Promotoren PCKprom-979/+32, PCKprom-1149/+32 und PCKprom-2500/+32 durch Glucagon	85
Abb. 21:	Stimulation der Luciferase-Genexpression unter der Kontrolle der Promotoren PCKprom-979/+32, PCKprom-1149/+32 und PCKprom-2500/+32 durch CPT-cAMP	87

Abb. 22:	Stimulation der Luciferase-Genexpression unter der Kontrolle der Promotoren PCKprom-1038/+32 und PCKprom-1068/+32 durch CPT-cAMP	89
Abb. 23:	Stimulation der Luciferase-Genexpression unter der Kontrolle der Promotoren des PCK1-Promotors PCKprom-1149/+32IL6REmut	91
Abb. 24:	Vergleich der Stimulation der Luciferase-Genexpression der PCK1-Promotorkonstrukte PCKprom-1149/+32 und PCKprom-1149/+32IL6REmut durch CPT-cAMP und IL6 in primär kultivierten Rattenhepatozyten.....	92
Abb. 25:	Vergleich der Stimulation der Luciferase-Genexpression aller verwendeten PCK1-Promotoren durch CPT-cAMP und IL6 in primär kultivierten Rattenhepatozyten	94
Abb. 26:	Schematische Darstellung der Struktur und Funktion des Glucagon-Rezeptors.....	99
Abb. 27:	Schematisches Modell der Desensitivierung des Glucagon-Rezeptors.....	102
Abb. 28:	Schematische Darstellung des IL6-Signalweges	105
Abb. 29:	Abschwächung der cAMP-abhängigen Aktivierung des PCK1-Gens durch IL6 durch Wirkung über eine potentielle C/EBP β -Bindungsstelle (A) und Verstärkung durch Wirkung über P3(I) und CRE1 (B)	110

VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tab. 1:	λ -DNA/ <i>Hind</i> III Fragmente und pBR322 DNA/ <i>Alu</i> I Fragmente (jeweils 500 ng DNA verdaut).....	31
Tab. 2:	PCR-Produkte mit Angabe der Primer und Fragmentlängen.....	33
Tab. 3:	Rekombinante Plasmide mit dem Luciferasegen unter Kontrolle unterschiedlicher PCK1-Promotorfragmente	46
Tab. 4:	Charakteristika der für die Detektion der PCK1-mRNA verwendeten RNA-Sonde	48
Tab. 5:	Übersicht der intravaskulären Infusionen in der isolierten Leberperfusion.....	59

ZUSAMMENFASSUNG

Im Verlauf einer Sepsis führt Dysregulation der vor allem durch Glucagon stimulierten hepatischen Glucose-Freisetzung zur Hypoglykämie. Interleukin-6 (IL6) ist der Hauptmediator der hepatischen Akut-Phase-Reaktion. In kultivierten Rattenhepatozyten hemmte IL6 die durch Glucagon ausgelöste Steigerung der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-1-(PCK1)-Genexpression und den die Steigerung vermittelnden cAMP-Anstieg. Ziel dieser Arbeit war es, den molekularen Mechanismus der Hemmung der Glucagonwirkung auf das PCK1-Gen durch IL6 zu charakterisieren, wobei zur Kontrolle der wie Glucagon über cAMP wirkende β -Agonist Isoproterenol eingesetzt werden sollte.

In primär kultivierten Rattenhepatozyten stimulierten Glucagon und Isoproterenol den Anstieg der PCK1-mRNA. IL6 hemmte sowohl den durch Glucagon als auch den durch Isoproterenol stimulierten PCK1-mRNA-Anstieg. Das ließ zunächst auf einen gleichen Angriffspunkt der Hemmung der PCK1-Genexpression durch IL6 schließen: IL6 könnte z.B. den beiden Stimuli gemeinsamen cAMP-Anstieg hemmen.

Glucagon und Isoproterenol steigerten in kultivierten Rattenhepatozyten die cAMP-Bildung, aber nur die glucagon-stimulierte cAMP-Bildung wurde durch IL6 gehemmt. Infolge intrazellulär erhöhter cAMP-Spiegel wurde die Glucose-Freisetzung aus Glykogen durch Glucagon und Isoproterenol in kultivierten Rattenhepatozyten stimuliert. IL6 hemmte die glucagon-stimulierte, aber nicht die isoproterenol-stimulierte Glucose-Freisetzung. Auch in der isolierten, nicht-rezirkulierend perfundierten Rattenleber stimulierten portales Glucagon und Isoproterenol die Glucose-Freisetzung. Bei gleichzeitiger portaler Applikation von IL6 wurde die Glucose-Abgabe nach Glucagon, nicht aber die nach Isoproterenol signifikant gehemmt. Die Hemmung der glucagon-stimulierten Glucose-Freisetzung durch IL6 war also auf die Verminderung des glucagon-stimulierten cAMP-Anstieges durch IL6 zurückzuführen. Da IL6 nur den cAMP-Anstieg nach Glucagon, aber nicht nach Isoproterenol hemmte, konnte der gemeinsame Angriffspunkt bei der Hemmung der PCK1-Genexpression durch IL6 nicht die cAMP-Bildung sein.

Zunächst sollte nun geklärt werden, warum IL6 nur den glucagon-, nicht aber den isoproterenol-abhängigen cAMP-Anstieg inhibierte. Hier schien ein Angriffspunkt am Glucagon-Rezeptor wahrscheinlich. Daher wurde ein Glucagon-Rezeptor-Bindungsassay mit Membranen aus kultivierten Rattenhepatozyten etabliert. IL6 verminderte die ^{125}J -Glucagon-Bindung innerhalb der ersten Minute transient. Die Verminderung der verfügbaren Glucagon-Rezeptoren könnte die Hemmung des glucagon-abhängigen cAMP-Anstiegs durch IL6 erklären. Weiterhin reduzierte IL6 in Membranen aus kultivierten Rattenhepatozyten die K_D der Bindungsstelle für Glucagon von 3 nM auf 0,5 nM; es erhöhte also die Affinität des Glucagons zum Rezeptor sechsfach. Dies könnte auch zur Inhibition des Glucagon-abhängigen cAMP-Anstiegs durch IL6 beitragen, da

bei einigen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren die Affinitätserhöhung zum Liganden mit einer Hemmung der cAMP-Bildung, vermutlich über eine Erschwerung der Dissoziation des G_s-Proteins, einhergeht.

Da der gemeinsame Angriffspunkt bei der Hemmung der glucagon- und isoproterenol-abhängigen PCK1-Genaktivierung durch IL6 nicht die cAMP-Bildung war, kam ein in der Signalkette weiter distal gelegener Schritt, z.B. ein Antagonismus im PCK1-Promotor gegen cAMP-stimulierte Transkriptionsfaktoren, die das Gen aktivieren, in Betracht. Diese Möglichkeit wurde in primären Rattenhepatozyten-Kulturen, die mit PCK1-Promotor-Luciferase-Genkonstrukten transfiziert wurden, untersucht:

IL6 hemmte weder die durch 0,5-5 nM Glucagon, noch die durch 0,1-10 µM CPT-cAMP stimulierte Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle der PCK1-Genpromotoren von -1149 bis +32 bp und von -2500 bis +32 bp. Dies könnte darauf hindeuten, daß der Angriffspunkt der IL6-abhängigen Hemmung der Expression des nativen PCK1-Gens außerhalb des bisher getesteten Promotorbereichs bis -2500 bp liegt.

IL6 verdoppelte jedoch die durch 1 und 10 µM CPT-cAMP, aber nicht die durch 1-5 nM Glucagon stimulierte Expression des Reportergens, wenn es unter der Kontrolle des PCK1-Promotors von -979 bis +32 bp stand. Dies deutete auf die Existenz eines IL6-abhängigen verstärkenden Elements im Bereich bis -979 bp und eines abschwächenden Elements im Bereich zwischen -1149 und -979 bp hin. Der Bereich zwischen -1149 und -980 bp wurde genauer durch Einsatz von Luciferase-Reporter-Genkonstrukten, die unter der Kontrolle des PCK1-Promotors von -1038 bis +32 bp und von -1068 bis +32 bp standen, analysiert. IL6 verstärkte die CPT-cAMP-stimulierte Expression des Luciferase-Reportergens deutlich, wenn es durch den Promotor von -1038 bis +32 bp, aber nur noch schwach, wenn es durch den Promotor von -1068 bis +32 bp kontrolliert wurde. Eine Computer-gestützte Sequenzanalyse des Bereichs zwischen -1038 und -1068 des Promotors ergab, daß bei -1051 bis -1042 bp eine potentielle C/EBPβ-Bindungsstelle lag. Diese Bindungsstelle wurde partiell in zwei Basen mutiert. IL6 steigerte die CPT-cAMP-abhängige Expression des Luciferase-Reportergens, wenn es durch den mutierten Promotor zwischen -1149 und +32 bp, aber nicht, wenn es durch den nativen Promotor des gleichen Bereichs reguliert wurde. Die C/EBPβ-Bindungsstelle war also offensichtlich an der Aufhebung der Steigerung der CPT-cAMP-abhängigen PCK-Genexpression durch IL6 beteiligt.

Insgesamt zeigen die Transfektionsexperimente, daß es zwar Angriffspunkte für eine positive und negative Regulation des PCK1-Genexpression durch IL6 im Bereich des PCK1-Promotors bis -1149 bp gibt, daß aber der Angriffspunkt für den IL6-Glucagon-Antagonismus außerhalb des untersuchten Promotorbereichs bis -2500 bp lokalisiert sein muß.

1. EINLEITUNG

1.1 Funktionen der Leber

Die Leber übernimmt zentrale Funktionen im Intermediärstoffwechsel des Organismus. Sie ist vor allem für die Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels verantwortlich und spielt dabei eine wichtige Rolle im Rahmen der Glucose-Homöostase. Zusätzlich übernimmt die Leber Abwehrfunktionen, sie baut sowohl Endo- als auch Xenobiotika ab und speichert Blut. Darüber hinaus ist die Leber an der Steuerung des endokrinen Systems beteiligt, indem sie (Pro)-Hormone und Mediatoren synthetisieren und freisetzen, aber auch inaktivieren kann (Jungermann und Katz, 1989). Weiterhin übernimmt sie sensorische Funktionen im Energie-, Elektrolyt- und Wasserhaushalt (Jungermann und Kietzmann, 1996).

1.1.1 Regulation der Glucose-Homöostase

Hepatozyten stellen mit 60 % der Zellzahl und 85 % der Zellmasse den Hauptanteil des Lebergewebes dar. Diese Zellen haben eine Schlüsselfunktion bei der Regulation der Glucose-Homöostase durch die glucoregulatorischen Hormone Glucagon und Insulin.

Alle bekannten Glucagoneffekte am Hepatozyten werden durch einen in der Zytoplasmamembran lokalisierten Glucagon-Rezeptor vermittelt, der die Adenylatzyklase aktiviert (Jelinek et al., 1993). Das gebildete cAMP stimuliert die Glykogenolyse und die Gluconeogenese, gleichzeitig sind die Glykogenbiosynthese und die Glykolyse gehemmt. Neben diesen schnellen, kurzfristigen Reaktionen am Hepatozyten reguliert cAMP langfristig die Biosynthese von Schlüsselenzymen der Gluconeogenese auf der Ebene der Transkription. Die Veränderung des Leberstoffwechsels als Antwort auf einen Glucagonstimulus ist somit auf erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentrationen zurückzuführen.

Insulin stimuliert über die Bindung an den in der Plasmamembran verankerten Insulin-Rezeptor (Lee et al., 1994) die Expression der Gene von Schlüsselenzymen der Glykolyse und der Glykogenbiosynthese. Da Insulin die Phosphodiesterase aktiviert, trägt es zur Erniedrigung der intrazellulären cAMP-Spiegel und zur Antagonisierung der Glucagonwirkung bei. Dazu gehört auch die Hemmung der Expression gluconeogener Schlüsselenzyme durch Insulin. Insulin verursacht in der Leber eine Umschaltung von Netto-Glucose-Abgabe auf -Aufnahme.

1.1.2 Regulation der PCK1-Genexpression durch Hormone

Die cytosolische Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-1-(PCK1) katalysiert als Kontrollenzym der Gluconeogenese die Umwandlung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat. Übereinstimmend mit dem Konzept der metabolischen Zonierung wird die PCK1 hauptsächlich in den periportalen Hepatozyten exprimiert (Jungermann und Kietzmann, 1996). Eine erhöhte PCK1-Genexpression ist im Verlauf der Postresorptionsphase und bei Diabetes mellitus nachgewiesen (Friedmann et al., 1993). Die Regulation erfolgt dabei hauptsächlich über die antagonistisch wirkenden Hormone Glucagon und Insulin. Glucagon aktiviert in primär kultivierten Rattenhepatozyten unter der permissiven Wirkung von Glucocorticoiden die PCK1-Genexpression (Runge et al., 1990). Neben Glucocorticoiden hat auch das Schilddrüsenhormon Trijodthyronin (T_3) eine permissive Wirkung bei der PCK1-Genexpression (Loose et al., 1985). Insulin dagegen vermindert die durch Glucagon induzierte Transkription des PCK1-Gens (Granner et al., 1984; Christ et al., 1990; Hanson et al., 1997).

Das PCK1-Gen der Ratte mit einer Länge von 6 kb, bestehend aus 10 Exons und 9 Introns, wird durch einen Promotor reguliert (Beale et al., 1985), in dem innerhalb von 500 bp aufwärts vom Transkriptions-Startpunkt die meisten der für die PCK1-Genexpression wichtigen *cis*-agierenden Sequenzen liegen: CRE 1 und 2 (cyclic AMP response element) sowie P1 bis P6. Die Elemente P3 und P4 sind nochmals in zwei bzw. drei Subdomänen unterteilt (Hanson et al., 1997; Lemaigre et al., 1994). Desweiteren sind eine Insulin-responsive Sequenz (IRS) im Bereich von -416 bis -402 bp (Forest et al., 1990), Glucocortikoid-responsive Sequenzen (GRU) zwischen -455 und -349 bp und -93 bis -86 bp (Imai et al., 1990 und 1993), sowie Trijodthyronin-responsive Sequenzen (TRE) von -330 bis -319 bp und im Bereich des P3 Elementes (Park et al., 1995; Giralt et al., 1991) beschrieben worden. Das CRE2 ist nur in der Sequenz, nicht in der Funktion ein durch cAMP stimulierbares Element (Bratke et al., 1999)

Die *trans*-agierenden Faktoren aus der Familie der „CAAT/enhancer binding proteins“ (C/EBP) sowie Jun/Fos regulieren über die Elemente CRE 1, P3 und P4 die PCK1-Genexpression (Park et al., 1990 und 1993; Gurney et al., 1992). Der Transkriptionsfaktor „cAMP regulatory element binding protein“ (CREB) bindet an das Element CRE 1 und hat zusätzlich eine verstärkende Wirkung bei -4800 bp (Park et al., 1990; Ip et al., 1990).

Die komplex regulierte PCK1-Genexpression beruht demnach auf der Koordination multipler *cis*-agierender Elemente und ihrer assoziierten Transkriptionsfaktoren.

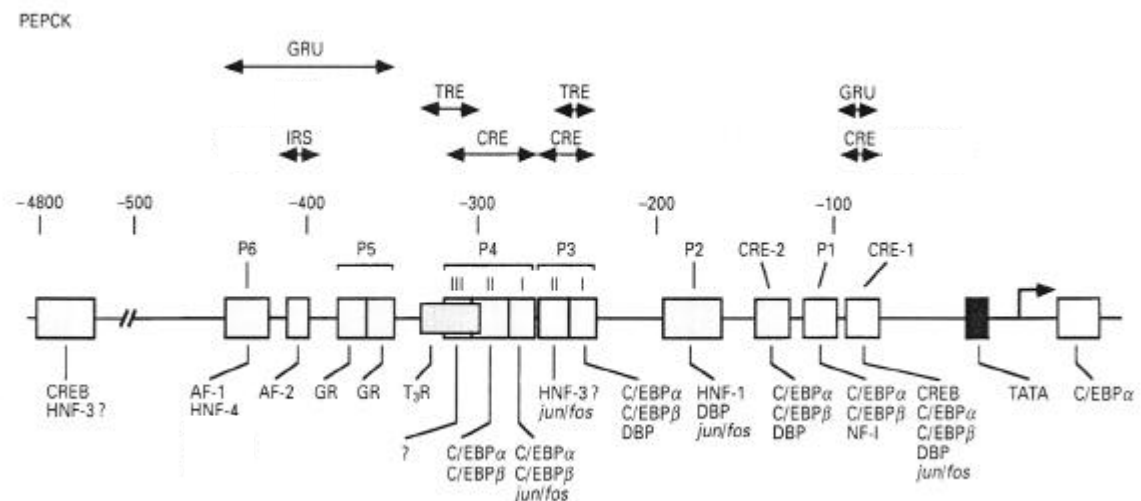


Abb. 1: Die regulatorische Region des Promotors des cytosolischen PCK1-Gens mit den dazugehörigen möglichen Bindungsproteinen. *Cis*-agierende Elemente sind als Boxen dargestellt, während *trans*-agierende Faktoren den entsprechenden Bindungsstellen im Promotor zugeordnet sind. Hormon-responsive Bereiche sind mit Pfeilen unterlegt. Abkürzungen: CREB: CRE-binding protein; AF: accessory factor; HNF: hepatic nuclear factor; GR: glucocorticoid receptor; C/EBP: CAAT/enhancer binding protein; DBP: D-binding protein; TATA: TATA binding Protein; GRU: glucocorticoid regulatory unit; IRE: insulin response element; NF: nuclear factor; T₃R: T₃-Rezeptor; TRE: thyroid hormone response element (Lemaigre et al., 1994).

1.2 Interleukin 6 und die Akut-Phase-Reaktion

Die komplexe Reaktion eines Organismus auf Gewebläsionen, Infektionen oder malignes Wachstum wird als Akut-Phase-Reaktion bezeichnet. Ziel dieser koordinierten Reaktion ist die Wiederherstellung der Homöostase. Zunächst werden die proinflammatorischen Cytokine TNF α , IL1 β und IL6 aus aktivierten Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen freigesetzt. Sie wirken als Mediatoren und verursachen eine systemische Reaktion, einhergehend mit neurologischen, endokrinen und metabolischen Veränderungen. Ein besonderes Merkmal der Akut-Phase-Reaktion sind die spezies-spezifischen Änderungen der Konzentration von Plasmaproteinen, der Akut-Phase-Proteine (Koj, 1996). Im Verlauf einer Akut-Phase-Reaktion wird in der Leber die Expression positiver Akut-Phase-Proteine verstärkt und die Expression negativer Akut-Phase-Proteine vermindert.

Positive Haupt-Akut-Phase-Proteine sind beim Menschen C-reaktives Protein und Serum-Amyloid A, während es bei der Ratte α_2 -Makroglobulin und α_1 -Saures Glykoprotein sind. Negative Akut-Phase-Proteine bei Mensch und Ratte sind Albumin und Transferrin (Heinrich et al., 1990).

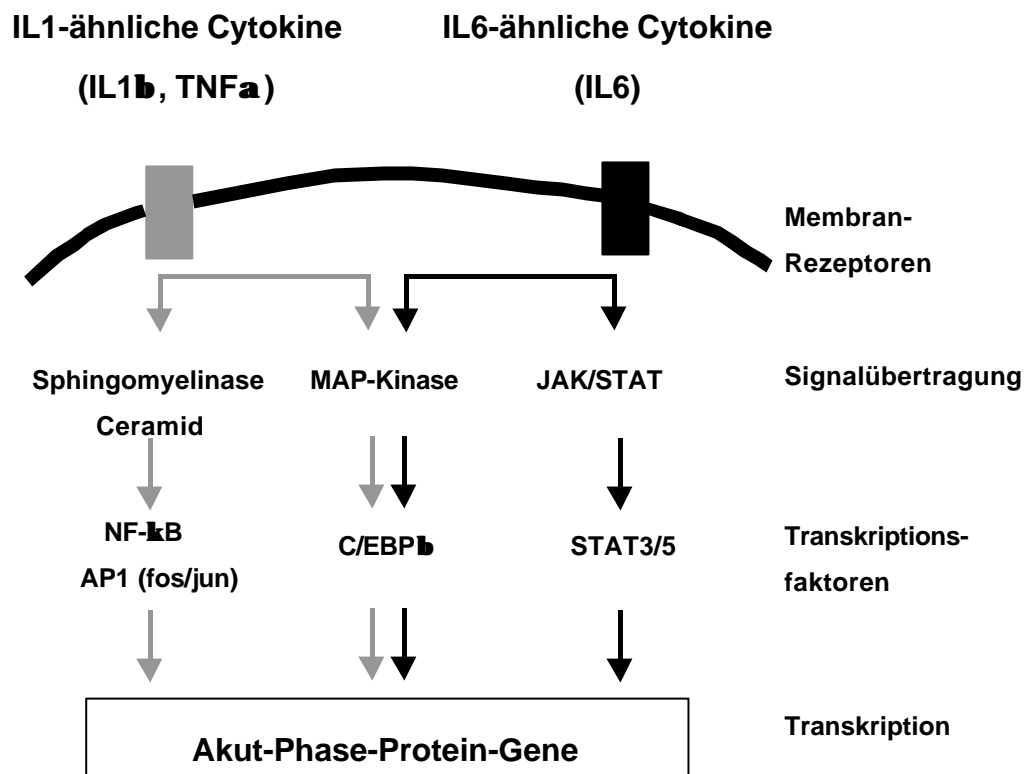


Abb. 2: Stimulation der Akut-Phase-Protein-Genexpression durch proinflammatorische Cytokine. IL1-ähnliche Cytokine stimulieren über den Ceramid-Signalweg die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP1 (fos/jun). Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie werden von IL6-ähnlichen Cytokinen über den JAK/STAT-Signalweg stimuliert. Sowohl IL1- als auch IL6-ähnliche Cytokine stimulieren über den MAP-Kinase-Signalweg den Transkriptionsfaktor C/EBP β (Ramadori und Christ, 1999).

Primäre Stimulatoren der Akut-Phase-Proteinsynthese sind die proinflammatorischen Cytokine TNF α , IL1 β und IL6, deren Aktion durch Glucocortikoide und Wachstumsfaktoren moduliert wird. Im Gegensatz zu den Cytokinen TNF α und IL1 β , die nur ein begrenztes Spektrum an Akut-Phase-Proteinen induzieren, stimuliert IL6 die Synthese aller positiven Akut-Phase-Proteine (Castell et al., 1989; Baumann et al., 1994). Die IL6-Synthese seinerseits wird sowohl durch TNF α als auch durch IL1 β stimuliert (Ng et al., 1994). In Experimenten mit IL6-defizienten Mäusen war die Akut-Phase-Antwort stark vermindert (Kopf et al., 1994). Somit scheint IL6 der Hauptmediator der Akut-Phase-Reaktion in der Leber zu sein.

1.2.1 Regulation der Glucose-Homöostase in der Akut-Phase-Reaktion

Im Verlauf einer prolongierten Akut-Phase-Reaktion, z.B. einer Sepsis, stellt die Leber initial Glucose durch die Steigerung des hepatischen Glykogenabbaus für den vermehrten Glucosebedarf in den peripheren Organen bereit. Kurzfristig wird ein hyperglykämischer Zustand erreicht. Darauf folgt eine Phase der Hypoglykämie, da bei gehemmter Glykogensynthese die hepatischen Glykogenvorräte erschöpft werden. Gleichzeitig ist die Gluconeogenese verringert (Mizock et al., 1995).

1.2.2 Regulation der PCK1-Genexpression durch Cytokine

Die verminderte hepatische Gluconeogenese wird durch die Hemmung der PCK1-Genexpression hervorgerufen. *In vivo* korrelierte die endotoxin-induzierte Hypoglykämie mit dem Abfall der PCK1-Aktivität (McCallum, 1982). Desweiteren wurde in Mäusen gezeigt, daß Endotoxine die Transkription des PCK1-Gens hemmten. Als Mediatoren der sepsis-induzierten Inhibition der PCK1-Genexpression wurden die Cytokine $\text{TNF}\alpha$ und IL6 identifiziert (Hill et al., 1991; Strassmann et al., 1993; Chang et al., 1996). In primär kultivierten Rattenhepatozyten hemmten die Cytokine IL6, IL1 β und $\text{TNF}\alpha$ die glucagon-stimulierte PCK1-Transkription und die Glucosebildung aus Lactat. Zusätzlich beschleunigten diese Cytokine den PCK1-mRNA Abbau (Christ et al., 1994 und 1996).

Im septischen Rattenmodell wurde gezeigt, daß die Hemmung der PCK1-Genexpression auf einer verminderten Wirkung von Glucagon bzw. 8-Br-cAMP beruhte (Deutschmann et al., 1995). In primär kultivierten Rattenhepatozyten hemmte IL6 den durch Glucagon stimulierten intrazellulären cAMP-Anstieg und somit die transkriptionelle Aktivierung des PCK1-Genpromotors. Dagegen hemmte IL6 nicht den durch Forskolin, einem direkten Aktivator der Adenylatzyklase, stimulierten cAMP-Anstieg. Dennoch hemmte IL6 die durch Forskolin aktivierte PCK1-mRNA Expression. Auch die durch das nicht-hydrolysierbare cAMP-Analogon CPT-cAMP stimulierte PCK1-Expression wurde durch IL6 gehemmt (Christ et al., 1997). Diese Daten lassen die Schlußfolgerung zu, daß IL6 den glucagon-stimulierten cAMP-Anstieg, damit gleichzeitig die PCK1-Expression entweder vor oder direkt auf der Ebene der cAMP-Bildung hemmte. Zusätzlich hemmte IL6 die PCK1-Genexpression direkt auf der Ebene der PCK1-Transkription.

1.3 Aufgabenstellung

Der direkte Angriffspunkt des IL6 bei der Hemmung der PCK1-Genexpression auf der Ebene der cAMP-Bildung und der Transkriptionsfaktorwirkungen am PCK1-Promotor war bisher unbekannt. Es sollte untersucht werden, ob der Glucagon-Rezeptor und/oder der PCK1-Genpromotor mögliche Ziele der IL6-Wirkung sind. Dazu sollte die Glucagonwirkung mit der Wirkung des β -Agonisten Isoproterenol, die sich in der intrazellulären Signalübertragung nicht unterscheiden, auf die cAMP-Bildung, die Glucosefreisetzung aus Glykogen und auf die Expression des PCK1-Gens verglichen werden. Mit Hilfe von Luciferase-Reportergenkonstrukten unter der Kontrolle verschieden langer Bereiche des PCK1-Genpromotors sollten Funktionsanalysen des Promotors durchgeführt werden. Seriell verkürzte sowie mutierte PCK1-Promotoren, die potentiell IL6-responsive Bereiche enthielten, sollten in kultivierte Rattenhepatozyten transfiziert werden, um IL6-regulierte Bereiche im Promotor zu identifizieren.

2. MATERIAL

2.1 Tiere und Tierhaltung

Die Experimente wurden mit Hepatozyten und an Gesamtleber aus männlichen Wistar-Ratten (180-300 g) der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen/Westfalen) durchgeführt. Die Tiere wurden frühestens 6 d nach Transport für die Experimente verwendet. Solange wurden sie im 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus (19 h bis 7 h Dunkelphase) mit freiem Zugang zum Futter (Rattendiät "ssniff", Fa. Spezialitäten GmbH, Soest/Westfalen) bei einer Raumtemperatur von 19 bis 23 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 50 % gehalten. Bei einer Futteraufnahme von 12-15 g und einem Wasserverbrauch von 12-25 ml pro Tag ergab sich eine wöchentliche Gewichtszunahme von 30-40 g. Sowohl die Präparation der Hepatozyten als auch die *in situ*-Experimente erfolgten in den ersten 3 h der Hellphase. Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Nembutal der Firma Sigma (München) (60 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert.

2.2 Bakterien, Vektoren und Plasmidkonstrukte

2.2.1 Bakterien

Die Plasmide wurden in die Sicherheitsstämme *E. coli* DH5 α und *E. coli* XL1-blue der Firma Stratagene transformiert.

2.2.2 Vektoren

pBS-Vektor

Die *in vitro*-Transkription wurde mit dem Plasmidvektor Bluescript (pBS-KS II) der Fa. Stratagene (Heidelberg) durchgeführt. Zusätzlich eignet sich dieser Vektor zur Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten sowie zur *in vivo*-Synthese von einzelsträngiger DNA (Sambrook et al., 1988).

Der pBS-II KS-Vektor ist ein Derivat des pUC19-Vektor und besteht aus 2961 bp. Er ist ein Transkriptionsvektor mit T3- und T7-RNA-Polymerase-Promotoren, einer multiplen Klonierungsstelle (Polylinker) mit singulären Restriktionsstellen und universalen und reversen Primer-Sequenzen (Abb. 3).

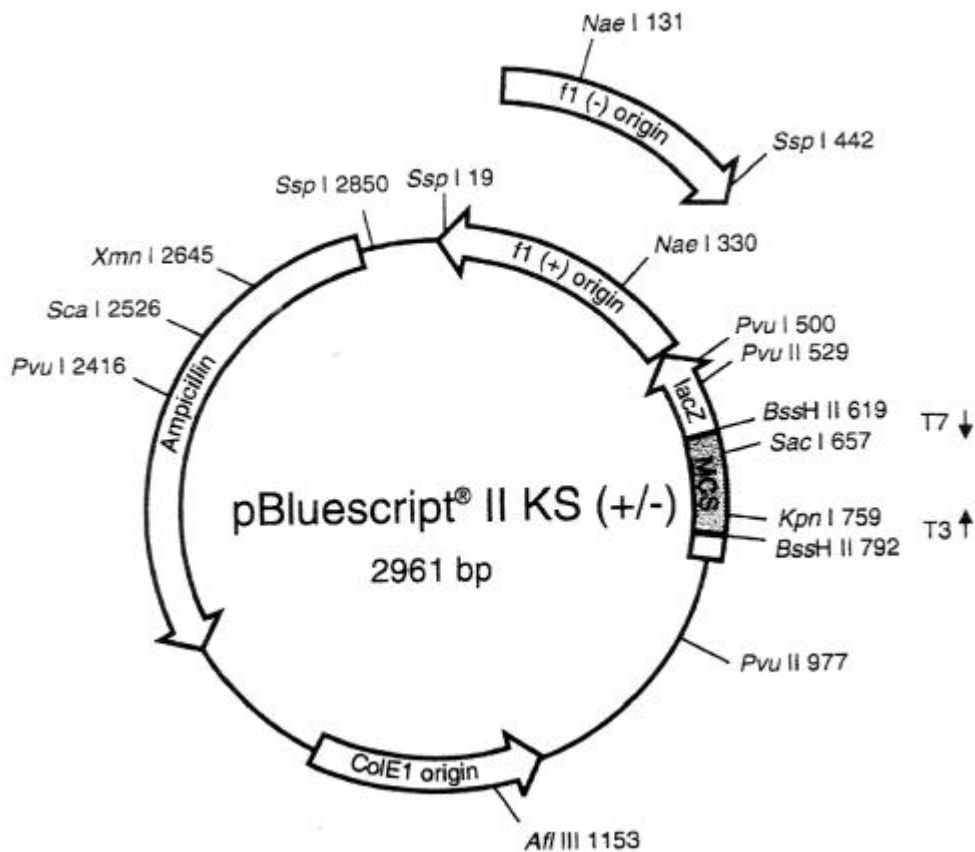


Abb. 3: Aufbau des Bluescript-Vektors (pBS). Der Vektor besitzt die Replikationsstelle ColE1 ori, das Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion transformierter Bakterien in Ampicillin-haltigen Medien. Das LacZ-Gen exprimiert β -Galactosidase und ermöglicht ein blau/weiß-screening rekombinanter Bakterien. In dieses Gen ist eine multiple Klonierungsstelle (MCS) integriert, die von den T3- und T7-Promotoren für die *in vitro* Transkription und von den Sequenzen für den universalen und reversen Primer flankiert wird.

pBS-PCK1.2:

Dieser Vektor lag bereits im Labor vor. Ein 1,2 kb Fragment der PCK1-cDNA aus Rattenleber wurde aus dem Vektor PC201 (Beale et al., 1985) in die *Pst* I-Schnittstelle des pBS-Polylinkers inkloniert. Die Restriktionsendonuklease *Hind* III linearisiert den Vektor so, daß durch *in vitro*-Transkription mit der T3-RNA-Polymerase ein antisense Transkript gewonnen werden kann. Mit Hilfe dieses Vektors wurden Digoxigenin-markierte *in vitro*-Transkripte für den spezifischen Nachweis der PCK1-mRNA generiert.

pGL3basic

Der pGL3basic-Vektor der Fa. Promega ermöglicht die Analyse von Faktoren, die potentiell an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. Es können zum einen *cis*-aktivierende Faktoren wie Promotor- oder Enhancer-Sequenzen, zum anderen aber auch *trans*-aktivierende Transkriptionsfaktoren untersucht werden. Der pGL3basic-Vektor enthält ein

Luciferase-Gen (*Photinus pyralis*) als Reporter-gen, so daß die transkriptionelle Aktivität in transfizierten eukaryotischen Zellen gut beobachtet werden kann. Außerdem kann der Vektor zur Synthese von einzelsträngiger DNA eingesetzt werden.

Der pGL3basic-Vektor ist ein Derivat des pUC19-Vektors und besteht aus 4818 bp. Die multiple Klonierungsstelle (Polylinker) mit singulären Restriktionsstellen wird von vorwärts und reversen Primer-Sequenzen flankiert. Der Vektor enthält ein Ampicillin-Gen zur Selektion, sowie zwei Polyadenylierungssignale (Abb. 4)

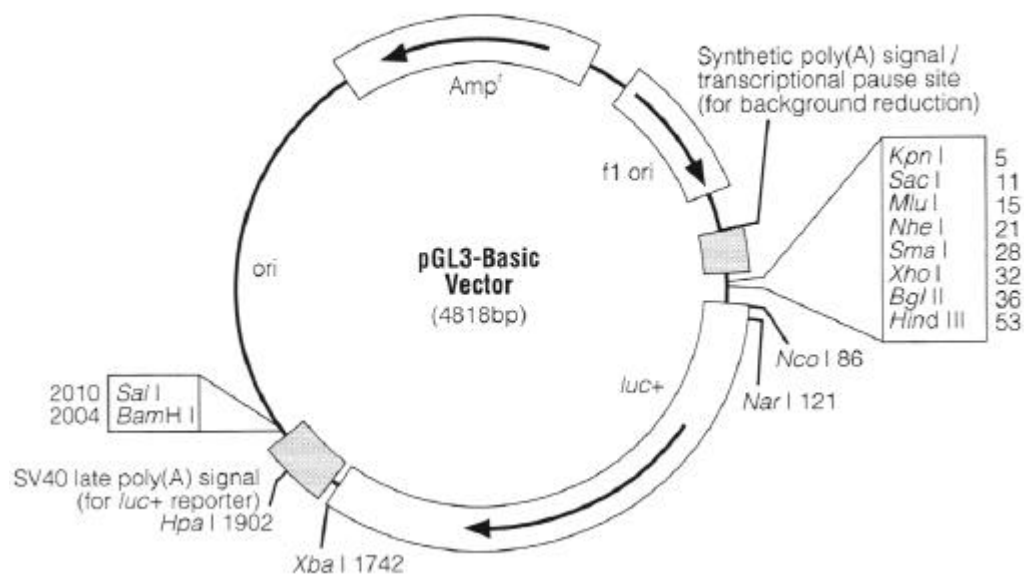


Abb. 4: Aufbau des pGL3basic-Vektors. Dem Polylinker (58 bp) folgt das Luciferase-Gen (*luc +*, 1649 bp) und ein Poly-A-Signal (221 bp). Ein weiteres Poly-A-Signal (153 bp) befindet sich vor dem Polylinker. Weiterhin sind ein Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase; Amp^r ; 857 bp) und zwei Replikationsursprünge, *ori* und *f1 ori*, enthalten. *Luc +* wird in Uhrzeiger-, Amp^r gegen die Uhrzeigerrichtung abgelesen.

pGL-PCKprom-2500/+32, pGL-PCKprom-1149/+32, pGL-PCKprom-979/+32

Diese Vektoren lagen bereits im Labor vor. Die jeweiligen PCK1-Promotor-Fragmente wurden in die *Sma* I-Schnittstelle des pGL3basic-Polylinkers einkloniert.

pGL-PCKprom-1038/+32, pGL-PCKprom-1068/+32, pGL-PCKpromIL6REmut-1149/+32

Ausgehend vom pGL-PCKprom-1149/+32 wurden verschiedene Polymerase-Kettenreaktionen durchgeführt, um so trunkierte und mutierte 5'-Enden des PCK1-Promotors zu generieren. Alle synthetisierten PCR-Produkte enthielten an den Enden eine *Bgl* II- bzw. eine *Kpn* I-Schnittstelle, die bereits in den Primern für die PCR enthalten

waren. Die PCR Produkte wurden in den mit *Bgl* II und *Kpn* I verdauten pGL3basic-Vektor einkloniert. Mit Hilfe der T4-Ligase wurden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Die verwendeten Konstrukte sind in Abb. 5 dargestellt.

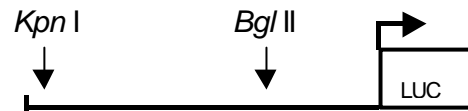
pGL-PCKprom-2500/+32



pGL-PCKprom-1149/+32



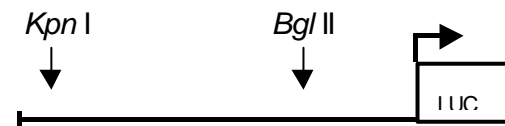
pGL-PCKprom-979/+32



pGL-PCKprom-1068/+32



pGL-PCKprom-1038/+32



pGL-PCKpromIL6REmut-1149/+32



Abb. 5: Luciferase-Genkonstrukte mit verschiedenen Fragmenten des PCK1-Promotors. Alle Konstrukte enthielten proximal zum Transkriptions-Startpunkt eine *Bgl* II- und distal eine *Kpn* I-Schnittstelle. Die schwarze Box stellt die mutierte Sequenz dar.

2.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma NAPS in Göttingen synthetisiert und über die HPLC aufgereinigt.

2.3.1 Oligonukleotide zur Generierung unterschiedlicher PCK1-Promotorfragmente

Oligonukleotide aus dem Promoter-Bereich des PCK1-Gens :

ON-PCK8Bgl

Antisense Primer von +32 bis +13 im 1. Exon des PCK1-Gens in der Ratte mit Bgl II-Schnittstelle

5' cccccAGATCTAAGGGTGTGTTCCCAGAGGG 3'

ON-PCK14Kpn

Sense Primer von -1038 bis -1018 im Promotor des PCK1-Gens der Ratte mit Kpn I-Schnittstelle

5' ccccgGGTACCGTGAAAGGTCTGTGTCTTGCA 3'

ON-PCK19Kpn

Sense Primer von -1068 bis -1048 im Promotor des PCK1-Gens der Ratte mit Kpn I-Schnittstelle

5' ggggcGGTACCGAGCAACTTCTCTCGGCTCG 3'

ON-PCK20Kpn

Sense Primer von -1149 bis -1129 im Promotor des PCK1-Gens der Ratte mit Kpn I-Schnittstelle

5' ccgggGGTACCTACTTCTGAGCCCAGCTGTG 3'

PCK; IL6REmut1

Sense Primer zum Generieren einer Mutation einer putativen IL6 responsiven Sequenz von -1061 bis -1032 im Promotor des PCK1-Gens der Ratte

5' TTCTCTCGGCTCGTT**G**TATGGCGTGAAGGT 3'

PCK; IL6Remut2

Antisense Primer zum Generieren einer Mutation einer putativen IL6 responsiven Sequenz von -1031 bis -1061 im Promotor des PCK1-Gens der Ratte

5' ACCTTCACGCCAT**ACA**ACGAGCCGAGAGAA 3'

Durch Computeranalyse wurde in der Sequenz des PCK1-Genpromotor (EMBL-Bank, Nr. X 92720) ein Element identifiziert, das eventuell IL6 responsiv ist. Die genuine Sequenz TCGTTCAAT wurde zu TCGTTGTAT mutiert (Kasutani et al., 1998).

Unterstrichene Großbuchstaben codieren eine Restriktionsenzym-Schnittstelle, nicht unterstrichene Kleinbuchstaben stellen nicht zur PCK1-Sequenz gehörende Basen dar. Sie wurden angefügt, um eine optimale Hybridisierung während der PCR zu erreichen.

2.3.2 Oligonukleotide für die PCR und die Sequenzierung der Plasmide

pBS-Vektor

UNI-Primer (Universaler Primer bzw. M13-Forward):

5' TGT AAA ACG ACG GCC AG 3'

REV-Primer (Reverser Primer bzw. M13-Reverse):

5' ACA GCT ATG ACC ATG ATT 3'

pGL3-Promotor-Vektor

GL2-Primer (Forward-Primer):

5' CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA 3'

RV3-Primer (Reporter-Vektor-Primer bzw. Reverse-Primer):

5' CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC 3'

2.4 Enzyme

Restriktionsendonukleasen:

Alle Restriktionsendonukleasen waren von MBI Fermentas.

Enzym	Erkennungssequenz	Puffer
<i>Bam</i> H I	G [^] GATCC	B
<i>Bgl</i> II	A [^] GATCT	M
<i>Hind</i> III	A [^] AGCTT	B
<i>Pst</i> I	CTGCA [^] G	H
<i>Sma</i> I	CCC [^] GGG	A

Inkubationspuffer

	A	B	H	M
Tris-Acetat	33 mM	-	-	-
Tris-HCl	-	10 mM	50 mM	10 mM
Mg-Acetat	10 mM	-	-	-
Na-Acetat	66 mM	-	-	-
MgCl ₂	-	5 mM	10 mM	10 mM
NaCl	-	100 mM	100 mM	100 mM
DTE	-	-	1 mM	1 mM
DTT	0,5 mM	-	-	-
Mercaptoethanol	-	1 mM	-	-
pH-Wert bei 37 °C	7,9	8,0	7,5	7,5

Restriktionsendonukleasen spalten nur unter bestimmten Pufferbedingungen. Für den Verdau wurden die vom Hersteller jeweils empfohlenen Puffer eingesetzt, bei denen das Enzym seine volle Aktivität besitzt.

DNA/RNA-modifizierende Enzyme:*Taq* DNA-Polymerase (Boehringer Ingelheim/ Heidelberg)

Die *Taq* DNA-Polymerase wird aus dem thermophilen Eubacterium *Thermus aquaticus* BM isoliert. Dieser Stamm produziert keine *Taq* I Restriktionsendonuklease. Das Enzym ist ein Monomer von 95 kDa; es ist eine 5'-3'-DNA-Polymerase, die keine 3'-5'- und 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt. Die *Taq*-Polymerase zeigt die höchste Aktivität bei einem pH-Wert von 8-9 und Temperaturen von 70-75 °C. Sie ist hitzebeständig, akzeptiert modifizierte dNTPs als Substrate und kann auch für die Markierung mit Digoxigenin eingesetzt werden. Die hohe Prozessivität der *Taq* DNA-Polymerase, das Fehlen von Exonukleaseaktivität und das hohe Temperaturoptimum ermöglichen die Verwendung dieses Enzyms für die PCR und die DNA-Sequenzierung (Produktinformation).

T4-DNA-Ligase (Gibco-BRL, Life Technologies/ Eggenstein)

Die T4-DNA-Ligase wurde aus *E. coli* Bakterien isoliert, die mit dem T4-Phagen (Wildtyp) infiziert worden waren. In Lösung liegt die T4-induzierte Ligase als Monomer vor, ihr MW beträgt ca. 68 kDa (Boyer, 1982). Sie verknüpft DNA-Stränge, indem sie die 5'-Phosphorylgruppe des einen mit der 3'-Hydroxylgruppe des anderen DNA-Moleküls

verbindet. Die T4-Ligase kann überhängende, aber auch glatte Enden, die keine einzelsträngigen Bereiche haben, miteinander verbinden.

T3-abhängige-RNA-Polymerase (Boehringer/ Mannheim)

Die Bakteriophagen T3- und T7-abhängigen-RNA-Polymerasen benötigen als Matrize ein doppelsträngiges DNA-Molekül. Der Vektor Bluescript besitzt Promotoren für die T3- und T7-DNA-abhängigen-RNA-Polymerasen. So kann, ausgehend von den Promotoren durch dieses Enzym *in vitro* einzelsträngige RNA in 5'-3'-Richtung synthetisiert werden. Die Transkript-Sequenz ist komplementär zu einer der DNA-Sequenzen des DNA-Doppelstranges. Je nach Orientierung des einklonierten DNA-Fragmentes kann so zwischen dem T3- und T7-Promotor gewählt werden, um die gewünschte mRNA-Sequenz zu gewinnen. Die Polymerasen sind Mg^{2+} -abhängig und benötigen die vier Ribonukleosidtriphosphate ATP, CTP, GTP und UTP zur Synthese. Das Produkt trägt auf der 5'-Seite drei Phosphorylgruppen und endet mit einer 3'-OH-Gruppe am 3'-Ende (Sambrook et al., 1989).

Sonstige Enzyme:

Collagenase A (Boehringer/ Mannheim)

Die Collagenase wird bei der Präparation von Rattenlebereinzellen verwendet. Sie ist eine Protease und löst das Collagen im Bindegewebe der Leber auf. Proteasen sind nicht spezifisch für bestimmte Substrate (bestimmte Proteine), sondern für bestimmte Strukturmerkmale der Peptidketten.

Lysozym (Sigma/München)

Lysozym ist ein bakterizides Enzym, das die glykosidische Bindung des Mureins in der Bakterienzellwand spaltet. Es ist eine Muramidase.

2.5 Nachweis-, Reinigungs- und Synthesesysteme ("Kits")

DIG-Nucleic-Acid Detection Kit, Boehringer/ Mannheim

JETstar, Plasmid Purification System, Genomed/ Bad Oeynhausen

Luciferase Assay Kit, Promega/ Mannheim

Qiaquick Extraction Kit, Qiagen/ Hilden

Qiaquick PCR Purification Kit, Qiagen/ Hilden

Qiaprep Spin Plasmid Miniprep-Kit, Qiagen/ Hilden

2.6 Stammlösungen

Die Stammlösungen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, mit sterilem H₂O angesetzt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Alle Lösungen für RNA-Versuche wurden mit DEPC-H₂O angesetzt.

Ammoniumacetat 7,5 M

		Endkonzentration
NH ₄ Acetat	57,8 g/100 ml	7,5 M

Die Lösung wurde autoklaviert.

Blocking-Reagenz (10 %)

50 mg Blocking-Reagenz (keine weiteren Herstellerangaben) wurde unter Erhitzen in 500 ml 1x Maleinsäure-Puffer gelöst. Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

Lithiumchlorid 4 M

		Endkonzentration
LiCl	17,0 g/100 ml	4 M

Die Lösung wurde autoklaviert.

Glucose 2 M

		Endkonzentration
Glucose	39,6 g/100ml	2 M

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

Magnesiumchlorid 1 M

		Endkonzentration
MgCl ₂	20,3 g/100ml	1 M

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

Natriumacetat 2 M pH 4.1

		Endkonzentration
3 M Na-Acetat	2 Teile	2 M
Essigsäure (konz.)	1 Teil	

Mit konzentrierter Essigsäure wurde der pH-Wert auf 4,1 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert.

Natriumacetat 3 M pH 5.2

		Endkonzentration
Na-Acetat	24,61 g	3 M
H ₂ O	ad 100 ml	

Der pH-Wert wurde mit einem großen Volumen an konzentrierter Essigsäure auf pH 5.2 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert.

PBS 10 x

		Endkonzentration
NaCl	81,82 g/l	1,400 M
KCl	2,02 g/l	0,027 M
Na ₂ HPO ₄	16,02 g/l	0,090 M
KH ₂ PO ₄	2,04 g/l	0,015 M

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde mit DEPC-H₂O angesetzt und autoklaviert.

SDS (10 %)

		Endkonzentration
SDS	10 g/100 ml	10 %

Fällt das SDS aus, muß es erwärmt werden, bis es wieder gelöst ist.

SSC 20 x

		Endkonzentration
NaCl	175,32 g/l	3,0 M
Natrium-Citrat	88,25 g/l	0,3 M

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert.

Tris/HCl 1 M

		Endkonzentration
Tris	12,11 g/l	1,0 M

Die Lösung wurde für verschiedene Stammlösungen mit HCl auf folgende pH-Werte eingestellt: pH 7,5; 8,0; 9,0. Die Lösungen wurden autoklaviert.

Tris/HCl 0,1 M

		Endkonzentration
Tris	1,21 g/l	0,1 M

Die Lösung wurde für verschiedene Stammlösungen mit HCl auf folgende pH-Werte eingestellt: pH 7,5; 8,0; 9,0. Die Lösungen wurden autoklaviert.

2.7 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in p.a. Qualität bezogen.

Amersham/ Braunschweig:

^{14}C -Glucose (310 mCi/mmol); J^{125} - Glucagon (2000 Ci/mmol); J^{125} -cAMP-Assay

Biometra/ Göttingen:

MOPS

Biomol/ Hamburg:

NBT, X-Phosphat, Pefa-Block, Trypsin Inhibitor

Boehringer Ingelheim/ Heidelberg:

Takara *Taq*-Polymerase

Boehringer/ Mannheim:

Anti-DIG-AP-AK, Blocking-Reagenz, Collagenase A, Desoxyribonukleosid 5'-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), DIG-RNA-Labeling-Mix, FCS, T3-Polymerase

Fluka Chemie/ Buchs, CH:

Glycerol, Guanidiniumthiocyanat

Gibco-BRL, Life Technologies/ Eggenstein:

Agarose, Medium M199, T4-DNA Ligase

MBI Fermentas/ St.Leon-Rot:

DNA-Standards

Merck/ Darmstadt:

Alle üblichen Laborchemikalien, Formamid, H₂O₂, Granutest 250 Glucose

Messer-Griesheim/ Düsseldorf:

Stickstoff-, Kohlendioxid-, Sauerstoffgemische

Oxoid/ Basingstoke, GB:

Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Hefe-Extrakt

Roth/ Karlsruhe:

Hepes, Phenol (in Tris-Puffer pH 7,0 - 7,5), Triethanolaminhydrochlorid

Serva/ Heidelberg:

Ampicillin, Ammoniumpersulfat, Bromphenolblau, Insulin, Leupeptin, Penicillin, Rinderserumalbumin, SDS

Sigma/ München:

Antifoam A, cAMP, Dexamethason, Dextransulfat, DMSO, DTE, Ethidiumbromid, Formamid, Glucagon, Lactat, Lysozym, N-Lauroylsarcosin, Natriumvanadat, Maleinsäure, PMSF, Saccharose, Streptomycinsulfat, Tris

2.8 Sonstige Materialien

3 MM-Whatmanpapier, verstärkte Nitrocellulose, GF 52 Rundfilter (Ø = 25 mm) Schleicher und Schüll/ Dassel

Hybond N Nylonmembran, Amersham/ Braunschweig

Kulturschalen, Kulturflaschen, Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Polystyrolröhrchen (1,5 ml), Greiner/ Nürtlingen

Polystyrolröhrchen (15 ml), Sarstedt/ Hannover

Sterilfilter Nalgene 0,2 µm, Sartorius/ Göttingen

Braunülen 2G14, Braun/ Melsungen

2.9 Geräte

Auto Lumat LB 953, Berthold/ Pforzheim

Automatische Pipettenhilfe, Typ Varipette 4710, Eppendorf/ Hamburg

Automatische Pipettenhilfen, Typ Pipetman P 20, P 200, P 1000, Abimed Analysen-Technik/ Langenfeld

Automatischer DNA-Sequenzier, Modell 373 A, Applied Biosystems/ Weiterstadt

Begasungsbrutschrank " Cytoperm 8080 " und " B 5060 EK/O₂ ", Gasmonitor, Heraeus/ Hanau

Eismaschine, Inco-Ziegra/ Isernhagen

Eppendorf-Tischzentrifugen, Typ 5414 und 5415 C, Eppendorf-Netheler/ Hamburg

Eppendorf-Thermostat, Typ 5320, Eppendorf-Netheler/ Hamburg

Flachbett-Gelelektrophoresekammern, Eigenbau der Institutswerkstatt

Flüssigkeitsszintillationszähler, PW 4700 mit Bordcomputer PW 4701, Philips/ Eindhoven, Niederlande

Halbmikro-Osmometer, Knauer/ Berlin

Hettich Zentrifuge, Typ 3850, Hettich/ Tuttlingen

Hybridisierungsschrank OV 3 und -gefäße, Biometra/ Göttingen

Labofuge II, Heraeus/ Hanau

Magnetrührer mit Heizung, Typ RCT B, Ika Labortechnik/ Staufen

Mikrowellengerät, Typ KOR-6105, Daewoo Electronics Deutschland/ Butzbach

Millipore-Anlage, " Milli-Q ", Millipore/ Neu-Isenburg

pH Meter, pH 535 Multi Cal, Schütt Labortechnik/ Göttingen

Photometer, Lambda 3 UV/VIS mit 8 Cell Programmer (Weef electronic), Perkin-Elmer GmbH/ Langen

Sartoriuswaagen, Typ 2254, H 120 und 2434, Sartorius/ Göttingen

Schlauchpumpe " Multifix ", Multifix Motoren, Alfred Schwinherr/ Schwäbisch Gmünd

Schüttelinkubator , Modell 3-25, New Brunswick Scientific/ Edison, New Jersey, USA

Sicherheitswerkbank, Typ MRF 06.12 - GS, Prettl Laminarflow und Prozeßtechnik/ Bempflingen

Sigma-Tischzentrifuge 3 E-1, Sigma Laborzentrifugen/ Osterode/Harz

Sorvall-Hochgeschwindigkeitskühlzentrifuge, RC 5 und RC 5 B, Du Pont Instruments/ Bad Nauheim

Spannungsgerät, Typ EPS 500/400, Pharmacia LKB/ Freiburg

Steril-Arbeitsbank, Typ Lamin Air, TL 2472, Heraeus/ Hanau

Sterilpumpe, DBP Nr. P 24333991, Schleicher und Schüll/ Dassel

Thermocycler, Bio-Med/ Theres

Thermostat, Typ 450 LE und Typ R 10/2, Meßgeräte-Werk Lauda, Dr. R. Wobser KG/ Lauda-Königshofen

Trockenschrank Typ U 40, Memmert/ Schwalbach

Ultraviolettstrahler, Typ N-90 GL, Konrad Benda/ Wiesloch

Ultraviolettstrahler, Modell C 62, Ultraviolett Productions Inc./ Californien, USA

Umkehrmikroskop Zeiss IM (Videokamera Hitachi HV-C20), Zeiss/ Göttingen

UV-Stratalinker, Modell 1800, Stratagene/ Heidelberg

Vakuumpumpe, Univac DM 04 mit Kühlfalle Unicryo MC 2L-60ØC und beheizbarer Zentrifuge Univapo 150 H, Uniequip Laborgerätebau/ Martinsried

Videodensitometer, Biotec Fischer/ Reiskirchen

Videodensitometer Kamera Hitachi KP-140, Hitachi AC Adapter Modell AP-130 E, Biotec Fischer/ Reiskirchen

Videokamera DNA ES 49 mit Mitsubishi Video Copy Processor, Herolab/ Wiesloch

Videoprinter und Transilluminator UVP, Herolab/ Wiesloch

Wasserbad, Typ K2R und Typ NB/S8, Meßgeräte-Werk Lauda, Dr. R. Wobser KG/ Lauda-Königshofen

Wippe, Eigenbau der Institutswerkstatt

3. METHODEN

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung von Rattenhepatozyten

Die Isolierung der Hepatozyten wurde in Anlehnung an die von Berry und Friend (1969) etablierte Methode durchgeführt. In den ersten 3 h der Hellphase wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion mit Nembutal (60 mg/kg Körpergewicht, Ansatz: 20 mg Nembutal/ml 0,9 % NaCl) narkotisiert und die Hepatozyten präpariert.

Perfusion der Leber

Die Bauchhöhle der ungefähr 250 g schweren Tiere wurde durch einen ventralen medianen Längsschnitt geöffnet und die Leber über eine in die Vena portae eingeführte Kunststoffkanüle mit 150-200 ml Präperfusionsmedium bei einer Flußrate von 30 ml/min nicht-rezirkulierend blutfrei gespült. Der Ausfluß erfolgte über eine oberhalb der Einmündung der Nierenvenen in die Vena cava inferior eingeführte Kanüle. Anschließend wurde die Vena cava inferior vor der Einmündung in das Herz abgebunden. Die Auflösung des Zellverbandes wurde durch eine 5 min andauernde rezirkulierende Perfusion mit einem Collagenase-Perfusionsmedium erreicht. Das Medium wurde hierzu über die in die Vena cava inferior eingeführte Kanüle mit einem Schlauch in das Sammelgefäß zurückgeleitet. Präperfusions- und Perfusionsmedium wurden vom Sammelgefäß ausgehend über einen Oxygenator mit einem Druck von 10-15 cm Wassersäule in das System gepumpt. Im Oxygenator wurden die Medien mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast und auf 37 °C temperiert.

Herstellung der Hepatozytensuspension

Die perfundierte Leber wurde dem Tier entnommen und in eine mit Medium M 199 gefüllte Glasschale überführt. Vorsichtig wurde die Leberkapsel mit zwei Pinzetten zerrissen und die Zellen unter leichtem Schwenken aus den Leberlappen herausgeschüttelt. Bindegewebs- und Kapselbestandteile wurden entfernt, größere Zellaggregate mittels Filtration der Suspension durch ein Nylonnetz (Porengröße 79 µm) abgetrennt. Über einen Percoll-Dichtegradienten wurden die Hepatozyten von Nicht-Parenchymzellen und Zelltrümmern getrennt. Nach dem letzten Waschvorgang (20 g, 3 min) wurden die Hepatozyten im Medium M 199 mit einer Dichte von $6,7 \times 10^5$ Zellen/ml aufgenommen.

Medien und Lösungen für die Hepatozytenpräparation

Alle Medien und Lösungen für die Zellkultur wurden in entmineralisiertem, quartzdestilliertem Wasser angesetzt, in autoklavierte Glasgefäße sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt.

Krebs-Ringer-Stammlösung :

		Endkonzentration
NaCl	7,00 g/l	120,0 mM
KCl	0,36 g/l	4,8 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,30 g/l	1,2 mM
KH ₂ PO ₄	0,16 g/l	1,2 mM
NaHCO ₃	2,02 g/l	24,4 mM

Die Lösung wurde mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) äquilibriert und auf einen pH-Wert von 7,35 eingestellt.

Präperfusionsmedium :

		Endkonzentration
EGTA	0,10 g/l	0,25 mM

gelöst in Krebs-Ringer-Stammlösung.

Collagenase-Perfusionsmedium :

		Endkonzentration
HEPES	3,37 g/l	15,0 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,59 g/l	4,0 mM
Collagenase	0,30 g/l	

gelöst in Krebs-Ringer-Stammlösung.

Die Collagenase wurde direkt vor jeder Hepatozytenpräparation im Perfusionsmedium gelöst, anschließend das Collagenase-Perfusionsmedium mit Carbogen 15 min äquilibriert und sterilfiltriert.

Medium M199 :

		Endkonzentration
Pulvermedium M 199 mit Earle´s Salzen ohne NaHCO ₃	9,77 g/l	
Glucose x H ₂ O	1,10 g/l	5,5 mM
HEPES	3,60 g/l	15,0 mM
NaHCO ₃	1,50 g/l	18,0 mM
Rinderserumalbumin	4,00 g/l	0,4 %

Lösung A wurde durch Lösen von 1,5 g NaHCO₃ in 550 ml H₂O hergestellt und mit Carbogen für mehrere Stunden begast. Der pH-Wert wurde auf 7,35 eingestellt.

Lösung B wurde aus Pulvermedium M 199, Rinderserumalbumin und HEPES in 450 ml H₂O hergestellt und der pH-Wert ebenfalls auf 7,35 eingestellt. Dann wurden Lösung A und B vermischt, nochmals mit Carbogen bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 7,35 begast und anschließend sterilfiltriert.

3.1.2 Primärkultur von Rattenhepatozyten

Die Hepatozytensuspension wurde sofort mit 4 % fetalem Kälberserum, das die Anheftung der Zellen an den Boden der Polystyrolschalen ermöglicht, 1 % Antibiotika-Stammlösung, 10⁻⁷ M Dexamethason und 5 x 10⁻¹⁰ M Insulin als permissiven Wachstumsfaktor versetzt. Die Kultivierung der Hepatozyten erfolgte über einen Zeitraum von 48 h in Begasungsbrutschränken bei einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 16 % O₂ (v/v), 5 % CO₂ und 79 % N₂ bei 37 °C. Je nach Experiment wurden die Hepatozyten folgendermaßen ausplattiert:

Art der Verwendung	Zellzahl / Volumen der ausplattierten Suspension	Ø der Kulturschale
cAMP-Bestimmung	6,7 x 10 ⁵ /1,0 ml	35 mm
Glucosebestimmung	2,0 x 10 ⁶ /3,0 ml	60 mm
Transfektion	1,0 x 10 ⁶ /1,5 ml	60 mm
RNA-Isolierung	2,0 x 10 ⁶ /3,0 ml	60 mm
Bindungsassay	2,1 x 10 ⁶ /8,0 ml	100 mm

Das Medium wurde nach 4 h (bei transfizierten Zellen 5 h) und nach weiteren 20 h mit den oben angegebenen Antibiotika- und Hormonkonzentrationen, aber ohne fetales

Kälberserum erneuert. Es wurden 1 ml Medium/35 mm Kulturschale, 2,5 ml Medium/60 mm Kulturschale und 10 ml Medium/100 mm Kulturschale zugegeben. Nach 48 h wurden die Hepatozyten zweimal mit insulinfreiem Medium gewaschen und die Experimente gestartet.

Hormon- und Antibiotika-Stammlösungen für die Hepatozytenkultur

Alle Lösungen wurden sterilfiltriert und bei - 20 °C aufbewahrt.

Antibiotika

Penicillin G, Natrium-Salz	0,64 g/100 ml
Streptomycinsulfat	1,17 g/100 ml

in 0,9 % NaCl-Lösung.

Dexamethason (100 µM)

Dexamethason	3,92 g/100 ml
--------------	---------------

in 0,9 % NaCl-Lösung.

Dexamethason wurde zunächst in 0,3 ml Ethanol gelöst und die Lösung dann mit 0,9 % NaCl-Lösung auf 100 ml aufgefüllt.

Glucagon (10 µM)

Glucagon	3,60 mg/100 ml
Rinderserumalbumin	100,00 mg/100 ml

in 0,9 % NaCl-Lösung.

Glucagon wurde bei einem pH-Wert von 10 gelöst, anschließend wurde die Lösung neutralisiert.

Insulin (10 µM)

Insulin	6 mg/100 ml
Rinderserumalbumin	100 mg/100 ml

in 0,9 % NaCl-Lösung.

Insulin wurde bei einem pH-Wert von 2,5 gelöst und die Lösung danach neutralisiert.

Bestimmung der Bindung von Glucagon an seinen Rezeptor

Nach 48 h Kulturdauer wurden die Hepatozyten 30 s lang a) nur mit 0,1 nM Glucagon und b) mit 0,1 nM Glucagon und 100 ng/ml IL6 stimuliert. Die Hepatozyten wurden sofort in flüssigem N₂ gefroren und wie unter 3.3.7 aufgearbeitet.

Bestimmung des intrazellulären cAMP-Anstiegs

Nach 48 h wurden die Hepatozyten zweimal mit je 1 ml Inkubationsmedium gewaschen und anschließend 10 min in 1 ml Inkubationsmedium äquilibriert. Dann wurden die Hepatozyten 3 min folgendermaßen stimuliert:

- mit Glucagon (0,1 nM bis 5 nM)
- mit Glucagon (0,1 nM bis 5 nM) und 100 ng/ml IL6
- mit Isoproterenol (10^{-5} M bis 10^{-9} M)
- mit Isoproterenol (10^{-5} M bis 10^{-9} M) und 100 ng/ml IL6

Der Versuch wurde beendet, indem das Medium entfernt und die Hepatozyten sofort in flüssigem N₂ eingefroren wurden. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung der Hepatozyten wie unter 3.3.5 beschrieben.

Inkubationsmedium

		Endkonzentration
HEPES	477,0 mg/100 ml	20,0 mM
NaCl	701,0 mg/100 ml	120,0 mM
KCl	35,8 mg/100 ml	4,8 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	29,6 mg/100 ml	1,2 mM
KH ₂ PO ₄	16,3 mg/100 ml	1,2 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	36,8 mg/100 ml	2,5 mM
Glucose x H ₂ O	99,0 mg/100 ml	5,0 mM
Lactat	22,4 mg/100 ml	2,0 mM

Das Inkubationsmedium wurde auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Erst kurz vor Versuchsbeginn wurden Glucose und Lactat im Medium gelöst.

Bestimmung der Glucose-Abgabe

Die Hepatozyten wurden nach 48 h folgendermaßen stimuliert:

- mit Glucagon (0,1 nM bis 5 nM)
- mit Glucagon (0,1 nM bis 5 nM) und 100 ng/ml IL6
- mit Isoproterenol (10^{-5} M bis 10^{-9} M)
- mit Isoproterenol (10^{-5} M bis 10^{-9} M) und 100 ng/ml IL6

Nach 5 min und nach weiteren 60 min wurden jeweils 100 µl Medium abgenommen und wie unter 3.3.4 aufgearbeitet.

Bestimmung der PCK1-mRNA

Die Hepatozyten wurden nach einem Zeitraum von 48 h folgendermaßen stimuliert:

- mit Glucagon (0,1 nM bis 5 nM)
- mit Glucagon (0,1 nM bis 5 nM) und 100 ng/ml IL6
- mit Isoproterenol (10^{-5} M bis 10^{-9} M)
- mit Isoproterenol (10^{-5} M bis 10^{-9} M) und 100 ng/ml IL6

Nach 2 h wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen und bis zur RNA-Präparation (3.2.11) bei -20 °C gelagert.

Bestimmung der Luciferase in transfizierten Hepatozyten

Die Hepatozyten wurden nach 48 h folgendermaßen stimuliert:

- mit Glucagon (0,1 nM bis 5 nM)
- mit Glucagon (0,1 nM bis 5 nM) und 100 ng/ml IL6
- mit Isoproterenol (10^{-5} M bis 10^{-9} M)
- mit Isoproterenol (10^{-5} M bis 10^{-9} M) und 100 ng/ml IL6
- CPT-cAMP (10^{-5} M bis 10^{-9} M)
- CPT-cAMP (10^{-5} M bis 10^{-9} M) und 100 ng/ml IL6

Nach 8 h wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen und wie unter 3.3.9 beschrieben aufgearbeitet.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Agarosegelelektrophorese

Der DNA-Nachweis und die Größenbestimmung erfolgte durch eine elektrophoretische Auftrennung in 1 % igen Agarosegelen. Es wurden 1,25 g Agarose („Ultra pure“-Qualität) in 125 ml 1x TEA-Puffer durch Erhitzen in einem Mikrowellengerät gelöst und luftblasenfrei in eine 12 x 20 cm große Flachbettkammer mit senkrecht eingestecktem Kamm gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine Gelelektrophoreselaufkammer gelegt. Die Kammer wurde mit 1x TEA-Puffer gefüllt. Alle Proben wurden mit 1/3 Volumen Auftragspuffer gemischt und die Geltaschen mit max. 20 µl Probe beladen. Die Elektrophorese wurde 1,5 h bei 60 V durchgeführt. Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Gel 10 min in Ethidiumbromid (200 µl 1 % iger Ethidiumbromidlsg. in 800 ml H₂O) gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert in die Basen der DNA und läßt sich durch UV-Licht zu blau-violetter Fluoreszenz anregen. Die DNA wurde auf einem UV-Leuchtkasten bei 300 nm detektiert und mit einer Videokamera aufgenommen. Im Vergleich zu einem gleichzeitig aufgetragenen Molekulargewichtsstandard konnte die Fragmentlänge bestimmt werden. Zur Quantifizierung der DNA wurde entweder die mit der Restriktionsendonuklease *Hind* III verdaute λ-DNA oder die mit *Alu* I verdaute pBR322 DNA als Standard eingesetzt. Die Banden dieses Standards enthalten definierte Mengen DNA (Tab. 2), so daß sich durch einen densitometrischen Vergleich der DNA-Gehalt abschätzen läßt.

10 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (10 x TEA)

		Endkonzentration
Tris	60,56 g/l	500 mM
Natriumacetat	16,40 g/l	200 mM
EDTA	7,44 g/l	20 mM

Der Puffer wurde mit 100 % iger Essigsäure auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und autoklaviert.

Auftragspuffer

		Endkonzentration
Bromphenolblau	0,25 g/100ml	0,25 % (w/v)
Glycerin	40,00 ml/100ml	40,00 % (v/v)
TAE-Puffer	10 ml 10 x Lsg. /100ml	1 x

Der Auftragspuffer wurde autoklaviert, aliquotiert und bei 4 °C gelagert.

Tab. 1: λ -DNA/*Hind* III Fragmente und pBR322 DNA/*Alu* I Fragmente (jeweils 500 ng DNA verdaut)

Kilobasenpaare (kb)	ng λ -DNA	Kilobasenpaare (kb)	ng pBR322
23,130	191,00	0,910	96
09,416	077,60	0,659	70
06,557	054,80	0,655	
04,361	036,00	0,521	55
02,322	019,88	0,403	42
02,027	016,72	0,281	30
00,564	004,64	0,257	
00,125	000,80	0,226	
		0,136	14

3.2.2 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Klonierung von PCR-Fragmenten in Vektoren erforderte eine Aufreinigung über eine DNA-Extraktion aus Agarosegelen. Dazu wurde der QIAquick Gel Extraction Kit der Fa. QIAGEN verwendet.

Die aufzureinigenden DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten, gewogen und in ein Mikrozentrifugationsgefäß überführt. Zu je 100 mg Gelstück wurden das dreifache Volumen der Lösung QX1 gegeben und die Gelstücke innerhalb von 10 min bei 50 °C gelöst. Anschließend wurde ein Gelvolumenanteil Isopropanol zugegeben, die Probe gemischt und auf die Säule gegeben. Die Säule wurde in einem 2 ml Sammelgefäß plaziert und 1 min bei 10000 x g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Nachdem die Säule mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen war, mußte erneut bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert werden, um den Waschpuffer vollständig zu entfernen. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Mikrozentrifugationsgefäß überführt und die DNA mit 30 μ l H₂O eluiert. Qualität und Quantität der aufgereinigten DNA wurde anhand einer Agarosegelelektrophorese überprüft (3.2.1).

Sämtliche Puffer wurden ohne nähere Konzentrationsangaben des Herstellers geliefert.

3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = polymerase chain reaction) ermöglicht eine enzymatische *in vitro*-Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen. Um die Zielsequenz zu amplifizieren, werden zwei einzelsträngige Oligonukleotide (Primer), ausreichende Mengen der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate und eine thermostabile DNA-Polymerase benötigt. Die Polymerase-Kettenreaktion war aus 25-35 Zyklen aufgebaut. Jeder Zyklus begann zunächst mit der Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 94 °C. Die Einzelstränge dienten als Matrize zur Synthese neuer DNA. Nach der Hitzedenaturierung wurde der Reaktionsansatz auf 50-60 °C abgekühlt, um die Hybridisierung der in großem Überschuß vorhandenen Primer mit komplementären DNA-Sequenzen auf den beiden DNA-Strängen zu ermöglichen (Annealing). Von diesen Startermolekülen ausgehend wurden nun an beiden Strängen in 5'→ 3'-Richtung komplementäre DNA-Stränge in Gegenwart von DNA-Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphaten bei 72 °C neu synthetisiert (DNA-Extension). Schon nach dem zweiten Zyklus entstand ein Produkt, dessen Länge dem Abstand zwischen beiden Primern entsprach. Da jede neu synthetisierte DNA-Sequenz als Matrize diente, ergab sich eine exponentielle Amplifizierung der Zielsequenz (Saiki et al., 1988). Das zyklische Erhitzen und Abkühlen übernahm ein Thermocycler.

Ausgehend vom pGL3-Expressionsplasmid in das ein PCR-Fragment des PCK1-Promotors der Ratte inkloniert ist, wurden verschiedene Polymerase-Kettenreaktionen durchgeführt, um so trunkierte und mutierte 5'-Enden des PCK1-Promotors zu generieren. Die neu synthetisierten PCR-Produkte wurden in ein Luciferase-Reporterplasmid inkloniert und in primär kultivierte Rattenhepatozyten transfiziert. Die Identität dieser PCR-Fragmente wurde durch Cycle-Sequenzierung mit anschließender Analyse im ABI DNA-Sequencer überprüft.

Die Amplifizierung der verschiedenen PCK1-Promotor-Fragmente erfolgte für 35 Zyklen im Thermocycler unter folgenden Bedingungen: 45 sek Denaturierung bei 94 °C, 45 sek Annealing bei 50 °C, 45 sek DNA-Synthese bei 72 °C. Vor Beginn des ersten Zyklus wurde ein Denaturierungsschritt bei 94 °C von 3 min eingefügt und, da am Ende einer PCR alle DNA-Stränge vollständig repliziert sein sollten, der Synthese-Schritt des letzten Zyklus auf 10 min verlängert. Eingesetzt wurden für einen PCR Ansatz 10 ng Template-DNA, 5 µl 10 x Puffer (optional 10 µl 5 x Enhancer), 2,5 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate, 1 mM MgCl₂, je 100 pmol sense bzw. antisense Primer sowie 1-2 U DNA-Polymerase in einem Volumen von 50 µl.

Allen PCR-Produkten, die inkloniert werden sollten, wurde am 5'-Ende eine *Kpn* I- und am 3'-Ende eine *Bgl* II-Schnittstelle angefügt. Diese PCR-Produkte wurden mit einer „proof reading“ DNA-Polymerase der Firma PAN amplifiziert, alle anderen PCRs wurden mit einer rekombinanten Taq-DNA-Polymerase der Firma Takara (Boehringer Ingelheim) durchgeführt. Puffer und dNTPs wurden jeweils mit der Polymerase mitgeliefert.

Im Anschluß an die PCR wurde ein Aliquot von 5 µl in einem 1 % igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.1), um die Produktlänge zu überprüfen. Die PCR-Produkte (Tab. 3) mit richtiger Länge wurden in das Plasmid pGL3basic einkloniert (3.2.6).

Tab. 2: PCR-Produkte mit Angabe der Primer und Fragmentlängen

PCR-Produkt	Primer	Länge der PCR-Fragmente in bp
PCKprom: -1038/+32	ON-PCK14Kpn	1070
	ON-PCK8Bgl	
PCKprom: -1068/+32	ON-PCK19Kpn	1090
	ON-PCK8Bgl	
PCKpromIL6REmut1: -1061/+32	PCK:IL6REmut1	1093
	ON-PCK8Bgl	
PCKpromIL6REmut2: -1149/-1031	ON-PCK20Kpn	118
	PCK:IL6REmut2	
PCKpromIL6REmut3: -1149/+32	ON-PCK20Kpn	1181
	ON-PCK8Bgl	
PCKprom: -979/+32	GLprimer2	1011
	RVprimer3	
PCKprom: -1149/+32	GLprimer2	1181
	RVprimer3	
PCKprom: -2500/+32	GLprimer2	2532
	RVprimer3	

Das Thermocycler Protokoll (25 Zyklen) für eine anschließende Sequenzierung der einklonierten PCR-Fragmente war wie folgt aufgebaut: 30 sek Denaturierung bei 96 °C, 15 sek Annealing bei 50 °C und 4 min DNA-Synthese bei 60 °C. Der Reaktionsansatz mit einem Volumen von 20 µl bestand aus 4 µl Premix der Firma ABI, 0,5-1 µg doppelsträngige DNA und 10 pmol Primer.

3.2.4 Überlappende Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Einfügen einer Mutation in die 5'-Region des PCK1-Promotors

Eine überlappende PCR ermöglicht es, gezielt Mutationen in bestimmte Sequenzabschnitte einzufügen. Es wurden Primer synthetisiert, die mit der Region der Ausgangssequenz hybridisieren, in die die Mutation eingefügt werden soll. Diese Primer sind zueinander komplementär und beinhalten die gewünschte Mutation, eine putative IL6 responsive Sequenz (Abb. 7). Ausgangsprodukte für die überlappende PCR sind zwei PCR-Produkte, die proximal bzw. distal zum Transkriptions-Startpunkt die Mutation tragen.

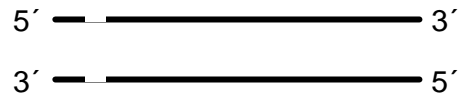
In einer ersten PCR wurde neben dem zur Ausgangssequenz PCKprom -1149/+32 komplementären antisense Primer ON-PCK8Bgl der sense Primer PCK:IL6REmut1 eingesetzt, der in der Sequenz von -1061 bp bis -1031 bp eine Mutation einfügte. So wurde das erste PCR-Produkt PCKpromIL6REmut1 mit einer Länge von 1093 bp generiert.

Das 118 bp lange zweite PCR-Produkt PCKpromIL6REmut2 mit einer Mutation am proximalen Ende wurde amplifiziert, indem der komplementäre sense Primer ON-PCK20Kpn und der antisense Primer PCK:IL6REmut2 mit einer mutierten Sequenz von -1061 bp bis -1031 bp für die PCR eingesetzt wurden.

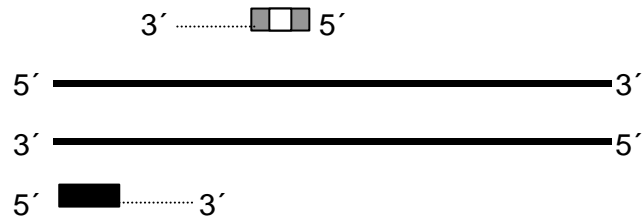
Beide PCR-Produkte überlappten im Bereich der Mutation und waren Ausgangssequenzen für die dritte PCR.

In dieser letzten PCR wurden äquivalent molare Mengen der PCR-Produkte PCKpromIL6REmut1 und PCKpromIL6REmut2, sowie 3'- bzw. 5'-flankierende Primer eingesetzt. Das neu generierte dritte PCR-Produkt PCKpromIL6REmut3 (-1149/+32) hat eine Länge von 1181 bp und trägt die Mutation. Es wurde die genuine Sequenz TCGTTCAAT gegen die Mutation TCGTTGTAT ausgetauscht.

1. PCR

1. Produkt: PCKpromIL6REmut1

2. PCR

2. Produkt: PCKpromIL6REmut2

3. PCR

3. Produkt: PCKpromIL6REmut3

■ = sense Primer PCK:IL6REmut1 (-1061/-1031 bp)

■ = antisense Primer PCK:IL6REmut2 (-1031/-1061 bp)

■ = sense Primer ON-PCK20Kpn(-1149/-1129 bp)

■ = antisense Primer ON-PCK8Bgl (+32/+13 bp)

Abb. 6: Schematische Darstellung der überlappenden Polymerase-Kettenreaktion

3.2.5 Reinigung von PCR-Produkten

Im Anschluß an eine PCR wurden die PCR-Produkte von Primern, Nukleotiden, Polymerase und Salzen mit Hilfe des PCR Purification Kits der Fa. QIAGEN abgetrennt.

Die DNA wurde an eine QIAquick Säule gebunden, nachdem ein Volumenanteil des PCR-Reaktionsansatzes mit fünf Volumenanteilen Puffer PB gemischt und auf die Säule appliziert wurde. Die Säule wurde in einem 2 ml Zentrifugationsgefäß plaziert und 30-60 s zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, die Säule mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen, indem sie nochmals 30-60 s zentrifugiert wurde. Dieser Durchlauf wurde ebenfalls verworfen und die Säule erneut mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um den Waschpuffer vollständig zu entfernen. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Zentrifugationsgefäß überführt und die aufgereinigte DNA mit 20-30 µl H₂O eluiert.

Alle Puffer wurden ohne nähere Konzentrationsangaben des Herstellers geliefert.

3.2.6 Klonierung der PCR-Fragmente in ein Reporter-Plasmid

Ligation der PCR-Fragmente in das Luciferase-Reportergen-Plasmid pGL3-Basic

Der pGL3-Basic-Vektor enthält das Luciferasegen, das unter der Kontrolle des SV40-Promotors als Reportergen fungiert. In seiner Polylinkerregion befindet sich neben der *Kpn* I - auch eine *Bgl* II -Schnittstelle. Aus diesem Grunde wurde allen PCR-Produkten am distal zum Transkriptions-Startpunkt liegenden Ende eine *Kpn* I- und am proximalen Ende eine *Bgl* II-Schnittstelle angefügt. Diese Schnittstellen wurden erzeugt, indem den Primern neben der zur Ausgangssequenz komplementären Basenabfolge zusätzlich Schnittstellen-codierende Basen angehängt wurden. Im Anschluß an die PCR wurden alle Ansätze über den PCR Purification Kit der Firma QIAGEN aufgereinigt und in 20 µl H₂O aufgenommen. Im Doppelverdau wurden dann alle PCR-Produkte gleichzeitig mit *Bgl* II und *Kpn* I geschnitten, so daß nun kohäsive Enden vorlagen. Pro µg DNA wurde 1 Unit Restriktionsenzym eingesetzt. Mit denselben Restriktionsenzymen wurde auch der pGL3basic-Vektor verdaut.

Ansatz für den Restriktionsverdau:

PCR-Produkt bzw. Vektor pGL3basic	10,0 µg
Restriktionsenzym <i>Bgl</i> II (10 U/µl)	1,0 µl
Restriktionsenzym <i>Kpn</i> I (10 U/µl)	1,0 µl
10 x Puffer	2,5 µl
H ₂ O	ad 25 µl

Die Restriktion wurde 12 h bei 37 °C durchgeführt. Jeder Ansatz wurde mit dem QIAquick Gel Extractions Kit der Firma QIAGEN aufgereinigt und in 30 µl H₂O aufgenommen. Ein Aliquot (2,5 µl) wurde in einem DNA-Agarosegel aufgetrennt und anhand der Größenmarker quantifiziert. Insert und Plasmid wurden im Verhältnis 3:1 mit einer DNA-Menge von 0,01-0,1 µg eingesetzt.

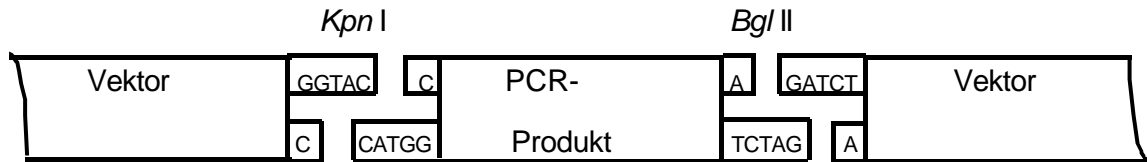


Abb. 7: Prinzip der kohäsiven Klonierung

Ligationsansatz:

PCR-Produkt	200 ng
pGL3basic-Vektor	75 ng
5 x Ligationspuffer (Gibco)	1 µl
T4-Ligase (Gibco)	1 µl
H ₂ O	ad 25 µl

Herstellerangabe über T4 DNA Ligase (GIBCO)

5 x T4-Ligase Puffer	250 mM Tris-HCl (pH 7.6) 50 mM MgCl ₂ 5 mM ATP 5 mM DTT 25 % (w/v) Polyethylene Glycol-8000
T4 Ligase in	10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 50 mM KCl 1 mM DTT 50 % (v/v) Glycerol

Aufbewahrung bei -20 °C.

Die Religation des Vektors wurde in einem Ligationsansatz ohne PCR-Produkt überprüft. Alle Ansätze wurden mind. 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde je 1 µl des Ligationsansatzes in elektrokompetente *E.coli* XL1 transformiert (s.u.) und in 1 ml SOC-Medium 1 h bei 37 °C angezogen. Aliquots der transformierten Bakterien wurden auf einer Ampicillin-Agarplatte ausgestrichen und 12 h bei 37 °C inkubiert. Die Vermehrung einzelner Kolonien erfolgte wiederum 12 h in 5 ml LB-Medium. Anschließend wurde die Plasmid-

DNA isoliert (3.2.7) und mit der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Anhand der Amplifizierung konnte die Richtigkeit der Klonierung überprüft werden, jedoch erfolgte immer zusätzlich eine Sequenzierung (3.2.8) der Plasmid-DNA, um die Vollständigkeit und Orientierung des Inserts zu bestimmen. Von den positiven Klonen wurden Glycerolkulturen angelegt.

Herstellung elektrokompetenter E. coli XL1

5 ml LB-Medium mit Tetrazyklin (10 mg/ml) wurden mit einer Einzelkolonie, die aus einem Ösenausstrich einer *E. coli XL1* Glycerolkultur gewachsen war, angeimpft und 12 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden 3 ml der Vorkultur in 250 ml tetrazyklinhaltiges LB-Medium überführt. Die Bakteriensuspension wurde 3-6 h bei 37 °C bis zu einer OD_{590 nm} von 0,3-0,4 weiterkultiviert. Alle nun folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt. Sämtliche Zentrifugationsschritte erfolgten in einer Sigma3 E-1 Zentrifuge. Zunächst wurden die Bakterien 10 min gekühlt, in 50 ml Röhrchen überführt und 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zell-Pellet in 200 ml 10 % Glycerin/Millipore H₂O aufgenommen und die Suspension auf 4 Röhrchen (je 50 ml) verteilt. Erneut wurde 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert, wiederum der Überstand verworfen und das Pellet in 25 ml 10 % Glycerin/ Millipore H₂O aufgenommen. Die Bakterien wurden wieder 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 12,5 ml 10 % Glycerin/Millipore H₂O resuspendiert. Nach einer letzter Zentrifugation (15 min bei 4000 rpm) wurde das Pellet in 500 µl 10 % Glycerin/Millipore H₂O aufgenommen, zu 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zum Gebrauch bei -70 °C gelagert. Die Kompetenz der Bakterien wurde anhand einer Transformation (3.2.6) mit einer definierten Menge an Plasmid-DNA, die ein Ampicillin-Resistenzgen enthielt, überprüft. Der Transformationsansatz wurde auf einem ampicillinhaltigen Agarboden ausplattiert, 12 h bei 37 °C inkubiert und die Kolonien gezählt. Die Transformationsrate von *E. coli XL1* liegt bei mehr als 10⁹ Transformanden/µg DNA.

LB-Medium (Luria Bertani)

Trypton	10 g/l
Hefeextract	5 g/l
NaCl	10 g/l

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt und das Medium sofort nach dem Ansetzen autoklaviert.

Herstellung chemischkompetenter E. coli DH5a

Eine Einzelkolonie *E. coli DH5a* wurde in 5 ml antibiotikafreiem LB-Medium 12 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Dann wurden 4 ml der Vorkultur in 400 ml LB-Medium überimpft. Die Bakteriensuspension wurde bei 37 °C bis zu einer OD_{590 nm} von 0,375 kultiviert. Alle nun folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt. Zunächst wurden die Bakterien 10 min gekühlt und dann 7 min bei 1600 g (GSA Rotor: 4000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 40 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen und in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Bakteriensuspension wurde 5 min bei 1100 x g (Sorvall Rotor: 2500 rpm) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in insgesamt 40 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen. Die Suspension wurde 30 min auf Eis inkubiert und abschließend 5 min bei 1100 x g (Sorvall Rotor: 2500 rpm) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert und in 100 µl Aliquots sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -70 °C. Die Kompetenz der Bakterien wurde wie oben beschrieben überprüft und liegt bei 10⁷ Transformanden/µg DNA.

CaCl₂-Lösung

		Endkonzentration
CaCl ₂	8,65 g/l	60 mM
Glycerol	150,00 ml/l	15 %
PIPES	3,02 g/l	10 mM

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt und das Medium sofort nach dem Ansetzen autoklaviert.

Transformation von E. coli XL1 und E. coli DH5a

Zur Transformation wurden kompetente Bakterien benutzt, die die Fähigkeit haben, zirkuläre, doppelsträngige DNA (Plasmide) aufzunehmen. Plasmide liegen extrachromosomal in der Bakterienzelle vor, werden unabhängig repliziert und exprimieren die Gene für die Konjugation von Bakterienzellen sowie für Resistenzgene. Eine natürliche Kompetenz weisen Bakterien nur in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase auf. Die Kompetenz der Bakterien, Plasmide aufzunehmen, lässt sich sowohl durch die Inkubation der Bakterien in CaCl₂ (*E. coli DH5a*) (Mandel and Higa, 1970) als auch durch Elektroporation (*E. coli XL1*) (Shigekawa and Dower, 1988) erhöhen und bleibt bei eingefrorenen Bakterien (-70 °C) für einige Monate erhalten. Ein aufgenommenes Plasmid verleiht dem transformierten Bakterium nach etwa einstündiger Inkubation bei 37 °C in einem antibiotikafreien Medium durch Expression eines Antibiotika-Resistenzgens die Resistenz gegen das entsprechende Antibiotikum (Cohen et al., 1972).

Die elektrokompenten *E. coli XL1* wurden zur Klonierung (3.2.6) genutzt, während die chemischkompetenten *E. coli DH5a* nur für Plasmidpräparationen (3.2.7) benötigt wurden.

Elektrokompente Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Ligationsansatz vermischt, in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und mit einer Stromstärke von 2,5 kV gepulst. Sofort wurde 1 ml warmes SOC-Medium zugegeben und die Bakteriensuspension 1 h bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Anschließend wurden Aliquots der Bakteriensuspension auf ampicillinhaltige Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Chemischkompetente Bakterien wurden ebenfalls vorsichtig auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid-DNA 5 min auf Eis inkubiert. Die gesamte Bakteriensuspension wurde auf ampicillinhaltige Agarplatten ausgestrichen und die Inkubation erfolgte 12 h bei 37 °C.

SOC-Medium

		Endkonzentration
Trypton	20,00 g/l	2,0 %
Hefeextract	5,00 g/l	0,5 %
NaCl	0,58 g/l	10,0 mM
KCl	0,19 g/l	2,5 mM
MgCl ₂	2,03 g/l	10,0 mM
MgSO ₄	2,46 g/l	10,0 mM
Glucose	3,96 g/l	20,0 mM

Das Medium wurde auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt, autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Erst kurz vor Gebrauch wurden MgCl₂, MgSO₄ und Glucose zugegeben.

Transformationsansatz *E.coli XL1*

Kompetente <i>E.coli XL1</i> (3.2.6)	50 µl
Ligationsansatz (3.2.6)	1 µl
SOC-Medium	1 ml

Transformationsansatz *E.coli* DHa

Kompetente <i>E.coli</i> DHa (3.2.6)	100 µl
Plasmid (3.2.7)	100 ng

Ampicillin-Agarplatten

1,25 % Bactoagar wurde in LB-Medium (s.o.) gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 50 °C wurde Ampicillin-Stammlösung bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben, vermischt und je 30 ml in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Schalen 12 h mit der Oberseite nach unten bei 37 °C getrocknet. Die Agarplatten wurden im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin	100 mg/ml
------------	-----------

Ampicillin wurde in H₂O gelöst und die Lösung auf einen pH-Wert von 7,0 mit HCl eingestellt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Anlegen einer Glycerolkultur

Bakterienkulturen wurden mit 1/3 Volumen sterilem Glycerin gründlich vermischt und sofort bei -70 °C eingefroren.

3.2.7 Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA

Die auf ampicillinhaltigen LB-Platten selektionierten Bakterienkolonien wurden analysiert. Einzelne Bakterienkolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze abgenommen und in 2 ml ampicillinhaltigem (100 µg/ml) LB-Medium 12 h bei 37 °C im Schüttelinkubator angereichert. Die Plasmide wurden durch Lyse der Bakterien isoliert und die einklonierten PCR-Fragmente entweder mit Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten oder aber durch eine PCR nachgewiesen.

Schnelle Minipräparation von Plasmid-DNA für die Überprüfung des Klonierungserfolgs durch PCR

Jeweils 100 µl der Bakteriensuspensionen wurden 5 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert (15.800 g, 14.000 rpm). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 15 µl H₂O resuspendiert, 5 min bei 95 °C erhitzt und die Probe nochmals wie

oben zentrifugiert. In einer Polymerase-Kettenreaktion (3.2.3) wurden 10 µl des Überstandes eingesetzt. 5 µl des PCR-Ansatzes wurde in einem 1 % igen Aarosegel (3.2.1) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Größenbestimmung der PCR-Fragmente erfolgte im Vergleich mit einem DNA-Längenstandard. Die Isolierung der positiven Klone erfolgte anschließend mit Hilfe des Miniprep Kits der Fa. QIAGEN.

Minipräparation nach QIAGEN für die Überprüfung des Klonierungserfolgs durch Sequenzierung und Restriktionsverdau

Jeweils 1,5 ml der Bakteriensuspensionen wurden in einem 2 ml Mikro-zentrifugationsgefäß 5 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert (15.800 g, 14.000 rpm). Nachdem das Pellet vollständig in 250 µl Puffer P1 resuspendiert worden war, wurden 250 µl Puffer P2 hinzugefügt und das Gefäß vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurden 350 µl Puffer N3 zugegeben, die Probe sofort geschüttelt und 10 min erneut wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine QIAprep-Säule appliziert, die DNA durch 30-60 s Zentrifugieren an die Säule gebunden. Danach wurde die Säule mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen. Der Durchlauf wurde verworfen und die DNA mit 30 µl H₂O eluiert. Ein Teil der eluierten DNA wurde in einem 1 % igen Aarosegel (3.2.1) elektrophoretisch aufgetrennt, um Reinheit und Größe des Plasmids zu überprüfen. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde für eine Sequenzierreaktion (3.2.8) eingesetzt. Zusätzlich wurde die Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen verdaut und bei einem positiven Ergebnis sowohl eine Glycerolkultur (3.2.6) angelegt als auch eine Plasmidpräparation im Maxi-Maßstab durchgeführt.

Alle Puffer wurden ohne nähere Konzentrationsangaben des Herstellers geliefert.

Restriktionsverdau

Plasmid-DNA	10 µg
10 x Puffer (enzymspezifisch, s. 2.6)	2 µl
Restriktionsenzym (10 U/µl)	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, dann mit 3 µl Probenpuffer gemischt und auf einem 1 % igen Agarosegel elektrophoretisch (3.2.1) aufgetrennt.

Isolierung von Plasmid DNA (Maxipräparation)

Das Prinzip der Reinigung der Plasmid-DNA über die Silikat-Säulen besteht darin, daß sukzessive weitere Bestandteile des Zellysates eluiert werden. Die Säulen enthalten

Kieselerdepartikel (ungefähre Größe 100 µm), die kovalent mit einer hydrophilen Substanz beschichtet sind. Durch die hohe Ladungsdichte auf der Oberfläche der Partikel entsteht ein weites Separationsspektrum: Durch Veränderung des pH-Wertes und der Ionenstärke der Puffer werden nacheinander Proteine, Metabolite, Polysaccharide, dNTP, dann RNA und einzelsträngige DNA und schließlich doppelsträngige Plasmid-DNA eluiert (Produktinformation).

Die Isolierung der Plasmid-DNA für die Transfektionsversuche erfolgte mit dem Jetstar Plasmid Maxi Kit der Fa. Genomed entsprechend den Herstellervorschriften.

Eine Kolonie der transformierten Bakterien wurden in 5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (100 µg Ampicillin/ml LB-Medium) 12 h bei 37 °C angezogen. 200 µl der Vorkultur wurden in 200 ml ampicillinhaltigem LB-Medium 12 h bis zu einer Dichte von 1×10^9 Zellen/ml (OD_{600} : 1 - 1,5) weiter angezogen. Dann wurden die Bakterien bei 2000 g (6.000 rpm, GSA-Rotor; 4 °C) innerhalb von 10 min abzentrifugiert und in 10 ml Lösung E1 resuspendiert. Die Bakterien wurden durch Zugabe von 10 ml Lösung E2 lysiert. Das Zellysat wurde mit 10 ml Lösung E3 neutralisiert und anschließend 10 min bei 16.300 g (10.000 rpm, GSA-Rotor; 20 °C) zentrifugiert. Die DNA wurde an eine mit 30 ml Lösung E4 equilibrierte „JETSTAR Maxi Säule“ gebunden und die Säule mit 60 ml Lösung E5 gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 15 ml Lösung E6. Anschließend wurde die DNA mit 10,5 ml Isopropanol 30 min bei 27.000 g und 4 °C (15.000 rpm, SS34-Rotor) präzipitiert, mit 70 % igem Alkohol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 500 µl H₂O aufgenommen.

Der DNA-Gehalt wurde bei 260 nm photometrisch bestimmt (1 OD entspricht 50 µg DNA/ml). Als Indikator für die Reinheit der DNA wurde das Verhältnis $OD_{260 \text{ nm}}/OD_{280 \text{ nm}}$ bestimmt. Es sollte zwischen 1,5 und 1,8 liegen. Zur Kontrolle der Qualität der Plasmid-DNA wurde 1 µl der DNA-Lösung auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen (3.2.1).

Lösungen für Plasmidpräparation

Lösung E1 (Zellresuspension)	50 mM Tris 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A	pH 8.0 mit HCl eingestellt E1 mit RNase A wurde bei 4 °C aufbewahrt
Lösung E2 (Zelllyse)	200 mM NaOH 1 % SDS	
Lösung E3 (Neutralisation)	3,1 M Kaliumacetat	pH 5.5 mit Essigsäure eingestellt
Lösung E4 (Equilibration)	600 mM NaCl 100 mM Natriumacetat 0,15 % Triton X-100	pH 5.0 mit Essigsäure eingestellt
Lösung E5 (Waschen)	800 mM NaCl 100 mM Natriumacetat	pH 5.0 mit Essigsäure eingestellt
Lösung E6 (DNA Elution) (Herstellerangaben)	1250 mM NaCl 100 mM Tris	pH 8.5 mit HCl eingestellt

Durch einen Restriktionsverdau der präparierten DNA wurde die Integration der PCR-Produkte in den Vektor überprüft.

Restriktionsanalyse

Plasmid-DNA	10 µg
10 x Puffer (enzymspezifisch, s. 2.6)	2 µl
Restriktionsenzym (10 U/µl)	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, dann mit 3 µl Probenpuffer gemischt und auf einem 1 % igen Agarosegel elektrophoretisch (3.2.1) aufgetrennt.

3.2.8 Sequenzierung klonierter Fragmente

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Cycle Sequencing-Methode mit dem ABI PRISM™ Big Dye Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit der Fa. ABI in einem automatischen DNA-Sequencer.

In einem Reaktionsansatz wurden vier mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen gekoppelte Didesoxynukleotide (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP, Big Dye DesoxyTM Terminatoren) mit nicht-markierten Desoxynukleotiden gemischt und einer Polymerase-Kettenreaktion zugeführt. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen PCR (3.2.3) wird hier nur ein Oligonukleotid-Primer eingesetzt, so daß derselbe Strang wiederholt abgeschrieben wird, bis der Einbau eines der Big Dye DesoxyTM Terminatoren den Strangabbruch bewirkt. So entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die am 3'-Ende mit basenspezifischen Farbstoffen markiert sind. Nach der Auftrennung im Sequenziergel wurden die vier Fluoreszenz-Farbstoffgruppen mit einem 40 mW Argon-Laser (540 nm und 625 nm) angeregt und die Fluoreszenzsignale durch ein Detektorsystem des DNA-Sequenzers anhand ihrer unterschiedlichen Emissionswellenlängen identifiziert und quantifiziert.

Für die Sequenzierung klonierter Fragmente wurden 1 µg Plasmid DNA (3.2.7) eingesetzt. Die DNA wurde mit 3 µl Big Dye Terminator RR Mix, mit 10 pmol sense- oder antisense-Oligonukleotidprimer vermischt und der Reaktionsansatz mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Dann wurde eine PCR mit folgenden Parametern durchgeführt: 30 sek Denaturierung bei 96 °C, 15 sek Annealing bei 50 °C und 4 min DNA-Synthese bei 60 °C. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Im Anschluß an die PCR wurden die Proben mit 80 µl H₂O, 10 µl Natriumacetat und 250 µl absolutem Ethanol versetzt und 15 min mit 15.800 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet mit 70 % igem Ethanol gewaschen. Nach einer 5minütigen Zentrifugation (15.800 g) wurde das Ethanol vorsichtig vollständig abgesaugt und das Pellet in der Vakuumzentrifuge 5 min getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 3 µl Formamid/EDTA-Lösung aufgenommen, 2 min bei 90 °C denaturiert und in einem 4 % igen Polyacrylamid-DNA-Sequenziergel aufgetrennt. Die elektrophoretische Trennung der Proben und die Detektion wurden vom zentralen Servicelabor des Instituts für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Humboldtallee 23, 37073 Göttingen durchgeführt.

Sequenzierung

		Endkonzentration
Plasmid	x µl	0,5 –1,0 µg
Primer	2 µl	10 pmol/Ansatz
Premix	3 µl	
H ₂ O	x µl	ad 20 µl

Die Sequenzierung des pGL3-Promotor-Vektors erforderte folgende Primer: GL2-Primer (Forward-Primer) für die Sequenzierung stromaufwärts vom Luciferasegen und RV3-Primer (Reporter-Vektor-Primer bzw. Reverse-Primer) für die Sequenzierung stromabwärts über die Polylinkerregion.

Der Ready Reaction Dye Deoxy-Terminator Kit (Premix) enthält: Ampli Taq DNA Polymerase FS, fluoreszenzmarkierte ddNTPs und dNTPs, dITP sowie Puffer (keine Konzentrationsangaben vom Hersteller Perkin-Elmer, Langen).

Die klonierten und sequenzierten Plasmide sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 3: Rekombinante Plasmide mit dem Luciferasegen unter Kontrolle unterschiedlicher PCK1-Promotorfragmente. Alle PCR-Produkte wurden in den pGL3 basic Vektor einkloniert.

PCR-Produkt	Plasmid	Klonierungsstelle	Insertgröße
PCKprom: -1038/+32	pGL-PCKprom: -1038/+32	<i>Kpn I, Bgl II</i>	1070 bp
PCKprom: -1068/+32	pGL-PCKprom: -1068/+32	<i>Kpn I, Bgl II</i>	1090 bp
PCKprom: -1149/+32	pGL-PCKprom: -1149/+32	<i>Kpn I, Bgl II</i>	1181 bp

3.2.9 Transfektion von Hepatozyten

Die Transfektion primär kultivierter Hepatozyten erfolgte mit der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode. Diese Methode wurde in Anlehnung an das von Graham und Van der Eb (1973) aufgestellte Protokoll durchgeführt. Dabei wurde DNA in Form von feinkörnigen Calcium-Phosphat-Präzipitaten auf die Zellen gebracht und von diesen durch Endocytose aufgenommen.

Transfektionsansatz für eine Kulturschale (60 mm)

		Endkonzentration
Plasmid-DNA bei Hepatozyten	2,0 µg	
H ₂ O	ad 150,0 µl	
CaCl ₂ 2,5 M	7,5 µl	125 mM
2 x Hepes	75,0 µl	

Der Transfektionsansatz wurde durch leichtes Schwenken vermischt und maximal 5-10 min bei RT inkubiert. Eine leichte Trübung des Transfektionsansatzes deutete auf die Bildung von DNA-Calcium-Phosphat-Präzipitaten hin. 150 µl des Ansatzes wurden zu

1,5 ml frisch ausplattierter Hepatozytensuspension in 60 mm \varnothing Schalen gegeben und sofort durch leichtes Schwenken gemischt. Die Hepatozyten wurden 48 h im Brutschrank unter 16 % O₂, 5 % CO₂ und 79 % N₂ bei 37 °C kultiviert. Das Medium wurde nach 5 h und nach 24 h gewechselt.

2 x HEPES

		Endkonzentration
HEPES	1,192 g/100 ml	50 mM
NaCl	1,636 g/100 ml	280 mM
Na ₂ HPO ₄	0,267 g/100 ml	1,5 mM

Der pH-Wert wurde mit 5 N NaOH auf 7,05 eingestellt, der Puffer in 10 ml Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

Calciumchlorid 2,5 M

		Endkonzentration
CaCl ₂	36,75 g/100 ml	2,5 M

3.2.10 Herstellung der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Transkription von pBS-cDNA mit Digoxigenin-UTP

Die Bestimmung der mRNA-Menge im Northern Blot erfolgte durch Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden und anschließender Farbreaktion.

Die markierten Sonden wurden mit der in dem Transkriptionsvektor pBS einklonierten cDNA als Template hergestellt, nachdem der Vektor linearisiert und die linearisierte Vektoren-DNA isoliert war. Hierbei wurden die entstandenen Transkripte durch den Einbau von Digoxigenin-markiertem Uridininmonophosphat (DIG-UMP) markiert.

Das Insert im pBS-Vektor wird von den Promotoren für die T3- und T7-RNA-Polymerase flankiert. Da die Orientierung der Inserts durch Sequenzierung der Plasmide festgestellt wurde, konnten durch Linearisierung des Plasmids mit dem entsprechenden Restriktionsenzym und anschließender Synthese ausgehend vom entsprechenden Promotor die antisense Sonde hergestellt werden. Nach der Herstellung des Digoxigenin-markierten Transkriptes wurde eine Detektion durchgeführt, um die Markierungseffizienz zu bestimmen. Die Sensitivität wurde im direkten optischen Vergleich zu einer im Kit der Fa. Boehringer enthaltenen markierten Kontroll-RNA im Dot-Blot Verfahren überprüft.

Die hergestellte Digoxigenin-markierte RNA-Sonde ist in folgender Tabelle (Tab. 5) dargestellt.

Tab. 4: Charakteristika der für die Detektion der PCK1-mRNA verwendeten RNA-Sonde. In der ersten Spalte ist die RNA-Sonde, in der zweiten Spalte die Größe der Sonde angegeben. Das Plasmid, aus dem die Sonde hergestellt wurde, sowie das entsprechende Restriktionsenzym und die RNA-Polymerase, die zur *in vitro*-Transkription benutzt wurden, sind in der dritten bzw. letzten Spalte aufgeführt. as: antisense; RE: Restriktionsenzym zur Linearisierung; Pol: Polymerase

RNA-Sonde	Größe	Plasmid	RE/RNA-Pol
PCK1 as	1200 bp	pBS-PCK1.2	<i>Hind</i> III/T3

Das Plasmid pBS-PCK1.2 lag bereits im Labor vor (Beale et al., 1985).

Linearisierung des Plasmides pBS-PCK1.2

Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der vollständigen Linearisierung des Plasmids, wurde 1 µl des Ansatzes auf ein 1 % iges Agarosegel aufgetragen. Als Vergleich diente ein linearisiertes Plasmid ohne Insert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung des Plasmids wurde das gewaschene Pellet in 33 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Linearisierungsansatz:

Plasmid	5,0 µg
<i>Hind</i> III (10 U/µl)	1,5 µl
10 x Puffer	2,0 µl
H ₂ O	ad 20,0 µl

In vitro-Transkription

Der Transkriptionsansatz wurde 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte eine erneute Zugabe von 0,5 µl RNA-Polymerase und eine weitere Inkubation bei 37 °C für 1 h. Die so gebildete Digoxigenin-markierte RNA wurde mit 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl absolutem Ethanol bei -20 °C für mindestens 2 h gefällt. Das Präzipitat wurde bei 12.000 g (10.000 rpm, SS34-Rotor) für 10 min bei 4 °C sedimentiert, mit 80 % igem Ethanol gewaschen und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Ansatz zur *in vitro*-Transkription:

linearisiertes Plasmid (ca. 1 µg)	11 µl
Transkriptionspuffer 10x	2 µl
Labeling Mix 10x	2 µl
RNasin (40 U/µl)	1 µl
T3-RNA-Polymerase (20 U/µl)	2 µl
DEPC-H ₂ O	2 µl

Zusammensetzung Transkriptionspuffer:

Tris/HCl pH 7,5	400 mM
MgCl ₂	60 mM
DTT	10 mM
NaCl	10 mM
Spermidin	10 mM

Zusammensetzung Labeling Mix 10x:

ATP	10,0 mM
CTP	10,0 mM
GTP	10,0 mM
UTP	6,5 mM
DIG-UTP	3,5 mM

Überprüfung der Markierungseffizienz

Auf eine Hybond N Membran wurden je 1 µl Transkript sowie 0,04-5 ng eines Digoxigenin-markierten DNA-Standards aufgetragen. Die Nukleinsäuren wurden im UV-Stratalinker 2 min mit 1200 µJ immobilisiert. Das Digoxigenin-markierte Transkript wurde wie folgt nachgewiesen: Die Membran wurde 5 min in Puffer 1 äquilibriert, anschließend mit 1 % igem Blockingreagenz für 20 min (1 % iges Blockingreagenz = 10 % Blocking-reagenz mit Puffer 1 auf 1 % verdünnt) inkubiert. Danach wurde die Nylonmembran für 20 min in 20 ml verdünnter Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase-Konjugat in 1 % igem Blockingreagenz verdünnt auf 75 mU/ml) inkubiert. Ungebundenes Antikörperkonjugat wurde anschließend durch 2 x 15 min Waschen in Puffer 1 entfernt. Nach 2 min Äquilibrierung in Puffer 3 wurden die gebundenen Antikörper mit einer

Substratlösung aus 45 µl NBT und 35 µl X-Phosphat in 10 ml Puffer 3 nachgewiesen. Die Reaktion wurde durch ausgiebiges Spülen der Membran mit Wasser gestoppt.

Die benötigten Lösungen sind unter 3.2.12 aufgeführt.

3.2.11 RNA-Isolierung aus primär kultivierten Rattenhepatozyten

Die Isolierung der Gesamt-RNA, die in den Northern Blot eingesetzt werden sollte, erfolgte nach der von Chomczynski und Sacchi (1987) beschriebenen Methode. Nach einer kombinierten Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion wurde die RNA aus der wäßrigen Phase isoliert und durch wiederholtes Waschen und Präzipitieren in Alkohol gereinigt.

Es wurden 4×10^6 Zellen aus Gewebekulturschalen ($\varnothing = 60$ mm) verwendet. Auf die gefrorenen Zellen in den Kulturschalen (3.1.2) wurden 800 µl Guanidiniumthiocyanat-Aufschlußpuffer gegeben. Die Zellen wurden mit einem Gummispatel abgeschabt und mehrfach resuspendiert. Das Homogenat wurde in ein 2 ml Eppendorf-Cup überführt, in das nun nacheinander 80 µl 2 M Natriumacetat (pH 4,1), 800 µl H₂O-gesättigtes Phenol und 160 µl Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 49:1) zugegeben wurden. Anschließend wurde der Ansatz gründlich 10 s gemischt, dann 20 min bei 10.000 g und 4 °C im SS34-Rotor zentrifugiert. In der wäßrigen Oberphase war die RNA gelöst. Die Oberphase wurde in ein neues 2 ml Eppendorf-Cup überführt, mit 1 ml Isopropanol versetzt und die RNA 1 h bei -20 °C gefällt. Alle folgenden Zentrifugationsschritte wurden im SS34 Rotor mit einer Drehzahl von 10.000 g für 10 min bei 4 °C durchgeführt.

Die Probe wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag in 300 µl Guanidiniumthiocyanat-Aufschlußpuffer gelöst. Es wurden 300 µl Isopropanol hinzupipettiert und die RNA erneut 1 h bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde wie zuvor zentrifugiert, der Überstand verworfen, der Niederschlag in 300 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Diese beiden letzten Arbeitsschritte wurden einmal wiederholt. Dann wurde die Probe in 300 µl DEPC-H₂O gelöst und durch Zugabe von 600 µl absolutem Ethanol entweder 12 h bei -20 °C oder 1 h bei -70 °C gefällt. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert und zweimal mit 500 µl 80 % igem Ethanol gewaschen. Die gereinigte RNA wurde in der Vakuumzentrifuge bei 37 °C 3 min getrocknet, anschließend in 25 µl 0,1 % igem SDS aufgenommen und 10 min bei 65 °C gelöst.

Um die Reinheit und die Konzentration der RNA zu ermitteln, wurde die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen. Eine OD von 1 bei 260 nm entspricht 40 µg RNA/ml. Der Quotient aus der OD bei 260 nm und bei 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der RNA. Bei einer proteinfreien RNA-Lösung ist der Quotient 2. Aufgrund möglicher Verunreinigungen durch Proteine verkleinert sich der Quotient. In der Regel lag er über 1,7.

Lösungen für die RNA-Isolierung

Alle Lösungen für RNA-Versuche wurden mit DEPC-H₂O angesetzt. DEPC inaktiviert RNasen im Wasser. Anschließend wurde das DEPC-H₂O autoklaviert.

Aufschlußpuffer

		Endkonzentration
Guanidiniumthiocyanat	48,20 g	4,000 M
Na-Citrat	2,50 ml 1 M Lsg.	0,025 M
N-Lauroylsarcosin	0,50 g	0,500 %
2-Mercaptoethanol	0,70 ml	0,100 M
30 % iges Antifoam A	0,33 ml	0,100 %
DEPC-H ₂ O	ad 100 ml	

Die Lösung wurde 30 min auf 60 °C erwärmt. Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 7,0 eingestellt. 2-Mercaptoethanol wurde zum Schluß hinzupipettiert.

Phenol (H₂O gesättigt)

3/4 Volumen Phenol wurden mit 1/4 Volumen H₂O vermischt.

Natriumacetat

		Endkonzentration
Na-Acetat	24,60 g	3,000 M
DEPC-H ₂ O	ad 100 ml	

Der pH-Wert der Lösung wurde mit konzentrierter Essigsäure auf 5,23 eingestellt.

Chloroform/Isoamylalkohol

Es wurden 49 Volumenanteile Chloroform mit 1 Volumenanteil Isoamylalkohol vermischt.

3.2.12 Quantifizierung von mRNA durch Northern Blot Analyse

Im Northern Blot werden Ribonukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen und durch UV-Crosslinking fixiert. Die folgende Hybridisierung mit spezifischen Sonden erlaubt die Identifizierung einer bestimmten RNA (Abb. 9).

Um eventuell vorhandene Rasen zu inaktivieren, wurden nur autoklavierte Lösungen, die mit DEPC-Wasser angesetzt worden waren, verwendet. Zusätzlich wurden die Elektrophorese- und die Blotkammer vor Versuchsbeginn mit 3 % igem H_2O_2 behandelt.

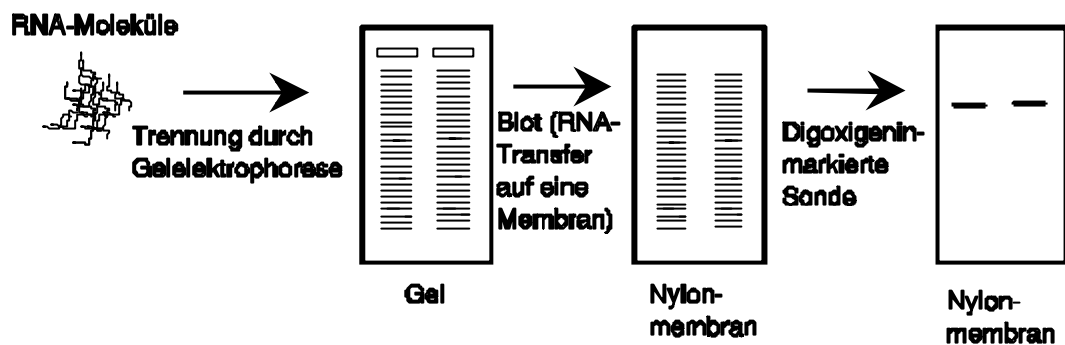


Abb. 8: Prinzip des Northern Blots. Ribonukleinsäuren werden unter denaturierenden Bedingungen mittels einer Agarosegelelektrophorese separiert, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer Digoxigenin-markierten spezifischen Sonde inkubiert. Die RNA wird visualisiert, indem ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Anti-DIG-Antikörper zum Nachweis eingesetzt wird.

Denaturierung der RNA

Zu jeder Probe mit nicht mehr als 15 μg RNA wurden 16,5 μl Ladungs-Puffer pipettiert. Die Proben wurden 10 min bei 60 °C denaturiert, anschließend 2 min auf Eis inkubiert und mit 5 μl Proben-Puffer versetzt.

Ladungs-Puffer

		Endkonzentration
Formamid	15,0 ml	
14,3 x MOPS	2,1 ml	26,7 mM
37 % iges Formaldehyd	5,4 ml	

Formamid wurde deionisiert, indem 100 ml Formamid mit 5 g Ionenaustauscher AG 501-X8 der Firma Bio-Rad 30 min bei Raumtemperatur gerührt und dann steriltfiltriert wurden. Der Puffer wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

MOPS 14,3x

		Endkonzentration
MOPS	5,93 g	286,0 mM
Na-Acetat	0,58 g	7,1 mM
EDTA	0,50 g	1,3 mM
DEPC-H ₂ O	ad 100 ml	

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

MOPS 10x

		Endkonzentration
MOPS	41,9 g	200 mM
Na-Acetat	4,1 g	50 mM
EDTA	3,7 g	10 mM
DEPC-H ₂ O	ad 1 l	

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

Proben-Puffer

		Endkonzentration
Glycerin	5 ml	50,0 %
0,5 M EDTA	20 µl	1,0 mM
Bromphenolblau	10 mg	0,1 %
DEPC-H ₂ O	ad 10 ml	

Der Puffer wurde aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

Elektrophoresebedingungen

Das denaturierende Agarosegel wurde in der Gelkammer mit 1 x MOPS-Puffer überschichtet (ca. 900 ml). Die Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und eine Spannung von 100 Volt für 2 h angelegt.

Eine Denaturierung der RNA wurde durch den Zusatz von Formaldehyd im Gel erreicht (Lehrach et al., 1977). Zur Herstellung eines 1,5 % igen Gels wurden 0,9 g Agarose in 49 ml DEPC-H₂O solange erhitzt bis die Agarose vollständig gelöst war. Nachdem die Agarose auf 50 °C abgekühlt war, wurden 6 ml 10 x MOPS und 5 ml Formaldehyd

hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen wurde das Gel in den vorbereiteten Gelträger (Größe: 10x14 cm) mit den Taschenformern für die Geltaschen gegossen.

Visualisierung der RNA mit Ethidiumbromid

Im Anschluß an die Gelelektrophorese wurde das Gel für 50 min in 150 ml einer 1 % igen Glycinlösung bei 37 °C geschwenkt. Dann wurden 2 µl Ethidiumbromid-Lösung (3.2.1) zugesetzt und weitere 10 min inkubiert. Ethidiumbromid bildete mit RNA Komplexe, die im UV-Licht (254 nm) fluoreszierten, so daß zwei Banden, die 28S- und die 18S- ribosomale RNA, erkennbar wurden. Das Gel wurde mit einer Video-Kamera fotografiert und anschließend 20 min in 20 x SSC gewaschen.

Transfer der RNA auf Nylonmembran

Die im Gel aufgetrennte RNA wurde nun durch Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran übertragen. Zunächst wurde die Nylonmembran (10x15 cm) mit H₂O angefeuchtet und anschließend mit 20 x SSC gewaschen. Die Transferapparatur wurde folgendermaßen aufgebaut (Abb. 10): Ein 1 mm starkes Filterpapier wurde mit Transferpuffer (20 x SSC) abgesättigt und war permanent mit dem Transferpuffer in Kontakt. Auf das Filterpapier wurde erst das Gel, dann die Nylonmembran luftblasenfrei gelegt. Abschließend wurden mehrere Schichten Filterpapier angeordnet. Diese Vorrichtung wurde nun mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgte über einen Zeitraum von mindestens 12 h. Nach Beendigung des Transfers wurde die RNA durch UV-Crosslinking auf der Nylonmembran fixiert.

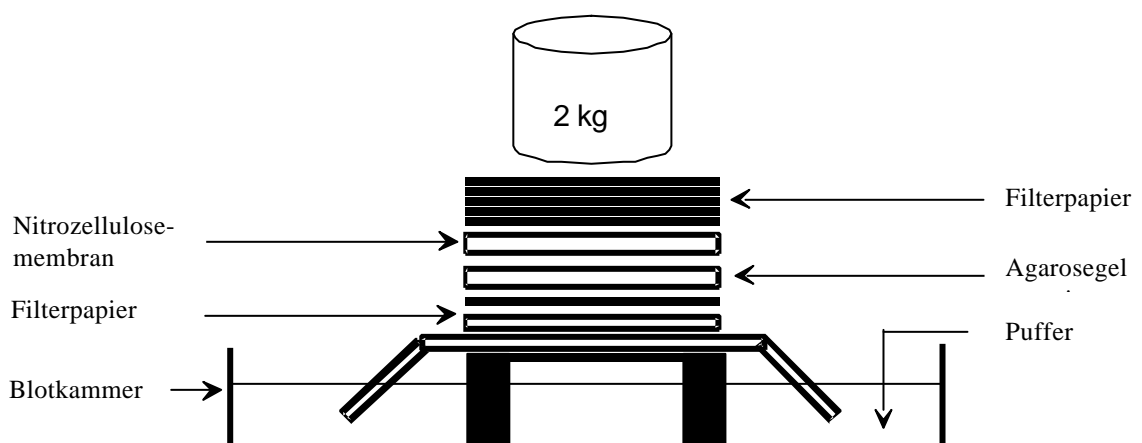


Abb. 9: Aufbau eines Kapillar Northern Blots.

Hybridisierung der RNA mit einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde

Mit Digoxigenin-markierten antisense RNA-Sonden wurde gezielt PCK1-mRNA identifiziert. Die Nylonmembranen wurden, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, vorhybridisiert. Die Vorhybridisierung erfolgte, nachdem die Membran mit 2 x SSC angefeuchtet wurde, in Hybridisierungsröhrchen für 1 h mit 10 ml Vorhybridisierungslösung bei 68 °C im Hybridisierungssofen. Anschließend wurde diese Lösung gegen 6 ml Hybridisierungslösung ausgetauscht, die 50 ng Digoxigenin-markierte antisense-RNA enthielt. Die Inkubation wurde 12 h bei 68 °C im Hybridisierungssofen durchgeführt. Alle folgenden Waschschrte erfolgten unter stringenten Bedingungen, um sowohl nicht hybridisierte Sonde zu entfernen als auch um instabile Hybride zu schmelzen. Es wurden nacheinander 2 x 5 min in 2 x SSC/0,1 % SDS bei Raumtemperatur, 2 x 30 min in 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei 68 °C gewaschen (Posthybridisierung).

Vorhybridisierungs- bzw. Hybridisierungslösung

		Endkonzentration
Deionisiertes Formamid	10,00 ml	50,00 %
10 % Blockingreagenz	4,80 ml	2,50 %
20 % SDS	0,02 ml	0,02 %
10 % N-Lauroylsarcosin	0,20 ml	0,10 %
20 x SSC	5,00 ml	5 x

Die Lösung wurde bei –20 °C aufbewahrt.

Detektion und Quantifizierung

Die Detektion und Anfärbung erfolgte mit dem Dig-Nucleic-Acid Detection Kit der Firma Boehringer Mannheim. Unter Verwendung eines Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase-Konjugats wurden die Digoxigenin-markierten Hybride in einem Immunoassay detektiert. In der Enzym-katalysierten Farbreaktion mit 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat (X-Phosphat) und Nitroblau-Tetrazolium (NBT) entstand ein unlöslicher blauer Niederschlag, der die Position der Hybridmoleküle sichtbar machte.

Zunächst wurde die Nylonmembran kurz (1 min) in 1x Maleinsäurepuffer geschwenkt. Zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurde die Membran 30 min in 100 ml 1 % igem Blockingreagenz (10 % iges Blockingreagenz mit 1x Maleinsäurepuffer auf 1 % verdünnt) inkubiert. Anschließend wurde die Nylonmembran 30 min in 20 ml verdünnter Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase-Konjugat in 1 % igem Blockingreagenz auf 75 mU/ml = 1:10.000 verdünnen = 2-3 µl Antikörper-Lösung

in 20 ml 1 % igem Blockingreagenz) bei RT inkubiert. Ungebundenes Antikörperkonjugat wurde anschließend durch zwei 15 minütige Waschschrte in Maleinsäurepuffer entfernt. Nach 2 min Äquibrierung in Puffer 3 wurde die Nylonmembran in einen Polypropylenbeutel mit 10 ml Färbelösung, die 35 µl X-Phosphat und 45 µl NBT enthielt, eingeschweißt. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C im Dunkeln. Nach dem Erscheinen der Banden, wurde die Membran mit Wasser gespült und so die Reaktion beendet.

Die Quantität der RNA-Banden auf der Nylonmembran wurde mit einem Videodensitometer der Firma Biotec-Fischer analysiert.

Puffer 1 (1 x Maleinsäurepuffer)

		Endkonzentration
Maleinsäure	11,61 g	100 mM
NaCl	8,78 g	150 mM
H ₂ O	ad 1 l	

Der pH-Wert von 7,5 wurde mit fester NaOH eingestellt und die Lösung autoklaviert.

Puffer 3

		Endkonzentration
Tris	12,11 g	100 mM
NaCl	5,84 g	100 mM
MgCl ₂	10,17 g	50 mM
H ₂ O	ad 1 l	

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 9,5 eingestellt.

NBT

		Endkonzentration
NBT	74 mg/ml in 70 % DMF	0,41 mM

Die Lösung wurde lichtgeschützt bei -20 °C gelagert.

X-Phosphat

		Endkonzentration
X-Phosphat	50 mg/ml in DMF	0,38 mM

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Isolierte Leberperfusion

Die isolierte Leberperfusion wurde an 260-300 g schweren Ratten durchgeführt, die mit 60 mg Nembutal/Kilogramm Körpergewicht narkotisiert waren. Nachdem die Bauchhöhle durch einen ventralen medianen Längsschnitt geöffnet war, wurde eine Kunststoffkanüle in die Vena portae eingeführt. Anschließend wurde sofort die Vena cava inferior durch einen Einschnitt geöffnet und die nicht-rezirkulierende *in situ*-Perfusion mit einem hydrostatischen Druck von 40 cm H₂O und einer Flußrate von 36 ml/min begonnen. Die Flußgeschwindigkeit in der Vena portae wurde über ein Flußmeßgerät eingestellt. Das vaskuläre Effluat wurde über eine in die Vena cava inferior fixierte Kunststoffkanüle gesammelt. Nun wurden die Vena portae, die Vena cava inferior und die Aorta ligiert (Abb. 6). Nach einer Präperfusionszeit von 20 min begannen die Experimente. Zur Bestimmung der aus der Leber freigesetzten Glucosemenge wurde jede Minute eine Probe aus der Vena cava inferior entnommen. Die Glucosebestimmung wurde wie unter 3.3.5 beschrieben durchgeführt.

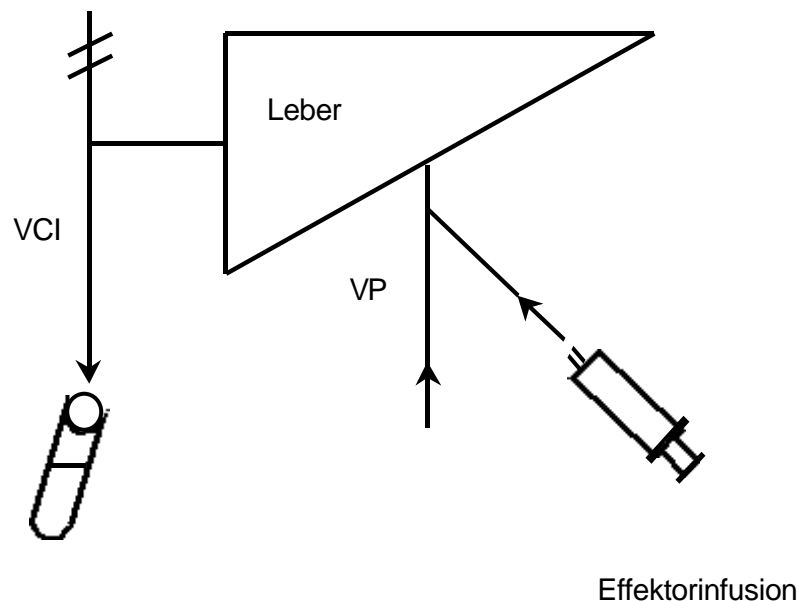


Abb. 10: Schema der isolierten Leberperfusion. Die Leber wird monovaskulär über die Vena portae (VP) perfundiert. Effektoren können direkt über einen Katheter in die VP infundiert werden. Das Perfusionsmedium verläßt das System in Pfeilrichtung über die Vena cava inferior (VCI) und wird fraktioniert gesammelt. Die Bestimmung der Glucosefreisetzung aus der Leber erfolgt in den Fraktionen.

Medien und Lösungen für die isolierte LeberperfusionKrebs-Ringer-Stammlösung:

		Endkonzentration
NaCl	7,130 g/l	122,0 mM
KCl	0,350 g/l	4,7 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,367 g/l	2,5 mM
KH ₂ PO ₄	0,163 g/l	1,2 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,296 g/l	1,2 mM
NaHCO ₄	2,016 g/l	24,0 mM
Streptomycin	0,117 g/l	0,012 % (w/v)

Perfusionsmedium :

		Endkonzentration
Glucose x H ₂ O	0,990 g/l	5,0 mM
Lactat-Sirup	0,846 g/l	2,0 mM
Pyruvat	0,022 g/l	0,2 mM
BSA	5,000 g/l	0,5 %

gelöst in Krebs-Ringer-Stammlösung. Das Medium wurde mit Carbogen äquilibriert, auf 37 °C erwärmt und der pH-Wert auf 7,36-7,44 eingestellt. Die Osmolarität des Mediums entsprach einem Wert von 285-300 mosm.

Intravaskuläre Infusionen

Die intravaskulären Infusionen (Tab. 1) wurden mit Hilfe eines Perfusors mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 30 ml/h (= 0,5 ml/min bei einer Gesamtflußrate von 36 ml/min) appliziert. Die benötigten Konzentrationen der zu infundierenden Substanzen in den Lösungen wurden entsprechend der Geschwindigkeit des Perfusors und der Verdünnung durch das Perfusionsmedium bei einer portalen Flußrate von 30 ml/min errechnet.

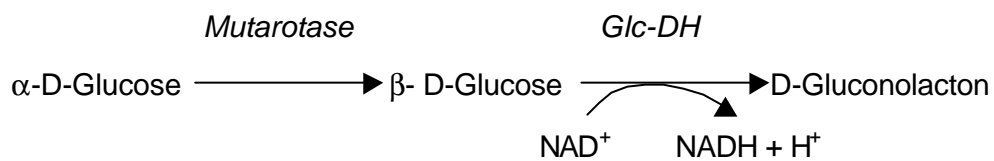
Tab.5: Übersicht der intravaskulären Infusionen

	Endkonzentration
Insulin	0,5 nM
Glucagon	0,1 nM
Isoproterenol	500 nM

3.3.2 Enzymatische Glucose-Bestimmung im Perfusat

Die Bestimmung der Glucosekonzentration in der Vena cava inferior (VCI) erfolgte mit dem Granutest der Fa. Merck und beruhte auf der Oxidation von Glucose zu Gluconolacton durch die Glucose-Dehydrogenase. Bei dieser Reaktion wurde proportional zur Glucosekonzentration NADH gebildet (Banauch et al., 1978).

Prinzip



Testansatz

750 μl Testlösung wurden mit 20 μl Probe aus der VCI 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte bei einer OD von 365 nm im Eppendorf-Photometer PCP 6112.

Testlösung

	Konzentration im Test
Phosphatpuffer pH 7,6	120 mM
NaCl	150 mM
Glucose-Dehydrogenase	5200 U/l
Mutarotase	110 U/l
NAD	2,2 mM

3.3.3 Bestimmung der Substratbilanz der Leber

Die Substratbilanz wurde berechnet, da die Leber sowohl Glucose aufnehmen als auch abgeben kann. Ein positiver Wert zeigt eine Nettoabgabe von Glucose an, ein negativer Wert entspricht einer Nettoaufnahme von Glucose.

Die Substratbilanz B der Leber wurde wie folgt definiert:

Substratbilanz B [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g Leber}$] =
hepatovenöse Substratabgabe - portales Substratangebot

hepatovenöse Substratabgabe [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g Leber}$] =
hepatovenöse Substratkonzentration [$\mu\text{mol}/\text{ml}$] x spezifischer hepatovenöser Fluß [$\text{ml} \times \text{min}^{-1} \times \text{g Leber}$]

portales Substratangebot [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g Leber}$] =
portale Substratkonzentration [$\mu\text{mol}/\text{ml}$] x spezifischer portaler Fluß [$\text{ml} \times \text{min}^{-1} \times \text{g Leber}$]

Daraus ergibt sich für die Substratbilanz B:

$$B = \text{Glc (VH)} \times F (\text{VH}) - [\text{Glc (VP)} \times F (\text{VP})]$$

Glc (VH) Posthepatische Glucosekonzentration in der Vena hepatica \cong Vena cava inferior [$\mu\text{mol}/\text{ml}$]

F (VH) Spezifischer Gesamtfluß in der Vena hepatica \cong Vena cava inferior [$\text{ml} \times \text{min}^{-1} \times \text{g Leber}^{-1}$]

Glc (VP) Prähepatische Glucosekonzentration in der Vena portae [$\mu\text{mol}/\text{ml}$]

F (VP) Spezifischer Fluß in der Vena portae [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g Leber}^{-1}$]

Es gilt $F (\text{VH}) = F (\text{VP})$, wenn die Leber monovaskulär nur über die Vena portae perfundiert wurde.

3.3.4 Glucose-Bestimmung im Medium kultivierter Hepatozyten

24 h nach Kulturbeginn wurde zur Markierung des Glycogens dem Medium 15 μl (0,111 MBq)/ml [$U\text{-}^{14}\text{C}$]-Glucose zugefügt und sofort 100 μl Probe zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität abgenommen. Nach weiteren 24 h wurden die Hepatozyten zweimal mit Medium gewaschen, das ohne Insulin, aber mit Dexamethason und 2 mM Lactat angesetzt wurde. Die Hepatozyten wurden in frischem Medium mit den angegebenen Hormon- und Cytokinkonzentrationen weiter kultiviert. Im Anschluß an eine 5minütige Equilibrierung wurden 100 μl Medium als Nullwert und nach 60 min erneut 100 μl Medium abgenommen. Diese Proben wurden auf eine Dowex-Formiat-Säule (1,0 x 0,5 cm) aufgetragen. Glucose wurde mit 2 ml Wasser eluiert, mit 5 ml Scintillations-Cocktail gemischt und die Radioaktivität gemessen. Die neu synthetisierte Glucose ließ sich aus der Differenz der Proben zum Zeitpunkt 60 min und dem Nullwert geteilt durch die spezifische Radioaktivität der Glucose, die im Markierungszeitraum im Medium vorlag, errechnen.

3.3.5 Bestimmung der cAMP-Konzentrationen

Die in Stickstoff gefrorenen Hepatozyten wurden mit einem Aufschlußpuffer überschichtet und 1 h bei 4 °C lysiert.

Aufschlußpuffer

		Endkonzentration
HCl	100 μl 37 % ige HCl	10 mM
SDS	1 ml	1 mM
H ₂ O	ad 100 ml	

IBMX wurde aus einer 100 mM Stammlösung, die bei -20 °C aufbewahrt wurde, immer frisch zugegeben.

Anschließend wurden die Zellen mit einem Schaber von den Kulturplatten gekratzt und 10 min in einer Tischzentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Von diesem Überstand wurden 20 μl im cAMP-Radio-Immuno-Assay (RIA) der Firma Amersham eingesetzt.

Das Prinzip der cAMP-Messung beruhte auf der Konkurrenz zwischen $J^{25}\text{-cAMP}$, im Testansatz vorgelegt, und nicht markiertem cAMP aus der Probe um einen cAMP-Antikörper. Da die Konzentration des Antikörpers und des radioaktiven cAMP festgelegt waren, war die Menge des gebundenen radioaktiven cAMPs invers proportional zu der cAMP-Konzentration in der eingesetzten Probe. Je höher die cAMP-Konzentrationen in der Probe waren, um so weniger $J^{125}\text{-cAMP}$ wurden vom Antikörper gebunden.

Die Trennung zwischen Antikörper-gebundenen J^{125} -cAMP und freiem J^{125} -cAMP wurde durch Inkubation des Ansatzes mit einem zweiten Antikörper erreicht. Dieser zweite Antikörper bindet Antikörper-gebundenes J^{125} -cAMP. Der zweite Antikörper war an magnetische Polymerartikel gebunden und ließ sich durch Zentrifugation sedimentieren.

Eine Standardkurve wurde mit definierten Mengen an nicht markiertem cAMP (2-128 fmol) aufgestellt.

RIA-Ansatz

Probenvolumen	20 μ l
Puffer	50 μ l
Tracer: J^{125} -cAMP	100 μ l
Antiserum (Rabbit-anti-Succinyl cAMP)	100 μ l

Der Ansatz wurde gut gemischt und 1 h bei 4 °C inkubiert. Dann wurden 500 μ l KODAK AMERLAX-M (Esel-anti-Kaninchen Serum gekoppelt an magnetisierbare Polymerpartikel) zupipettiert, kurz gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 1500 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Radioaktivität im Sediment gemessen.

3.3.6 Membranpräparation

Je zwei Kulturschalen mit gefrorenen Hepatozyten wurden mit 1 ml Homogenisierungspuffer abgeschabt und mit 1 ml nachgespült. Die Zellen wurden im Glashomogenisator mit 10 Auf- und Abwärtsbewegungen aufgeschlossen. Das Homogenat wurde in ein dickwandiges Zentrifugenröhrchen für die Ultrazentrifuge überführt und 1 h bei 100.000 g (40.000 rpm, TFT 65.13 Rotor, TGA-50 Zentrifuge) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 500 μ l Bindungspuffer aufgenommen und noch einmal im Glashomogenisator homogenisiert. Die Membransuspension wurde immer frisch eingesetzt.

Homogenisierungspuffer

		Endkonzentration
Saccharose	85,58 g/l	250 mM
Tris/HCl	10 ml 1M pH 7.5/l	10 mM
EDTA	2 ml 0,5 M pH 8/l	1 mM
MgCl ₂	5 ml 2 M/l	10 mM
PEFA-Block	x µl 100 mM	1 mM
Leupeptin	x µl 20 mM	20 µM
Trypsin Inhibitor	x µl 0,5 mM	0,5 µM

PEFA-Block, Leupeptin und Trypsin Inhibitor wurden kurz vor Versuchsbeginn zugefügt. Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt und die Lösung bei 4 °C gelagert.

Bindungspuffer

		Endkonzentration
MES	2 g/l	10 mM
MgCl ₂	5 ml 2,0 M/l	10 mM
EDTA	2 ml 0,5 M pH 8/l	1 mM

Der pH-Wert wurde mit 10 N NaOH auf 7.5 eingestellt und die Lösung bei 4 °C gelagert.

3.3.7 Kompetitiver Bindungsassay

Die Bindungsreaktion wurde in Polypropylen-Röhrchen (Fa. Sarstedt, 5 ml, 75 x 12 mm) durchgeführt. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte, indem neben einem Ansatz mit 10 µl 0,5 nM J¹²⁵-Glucagon und einer definierten Menge an Membranproteinen der gleiche Ansatz mit 5 µM nicht-markiertem Glucagon inkubiert wurde. Zusätzlich wurden Ansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen (10⁻⁶ bis 10⁻¹² M) an nicht markiertem Glucagon angesetzt. Alle Ansätze wurden mit Assaypuffer (1 % BSA) so weit aufgefüllt, daß nach Zugabe der Membranen das Reaktionsvolumen immer 100 µl betrug. Die Bindungsreaktion wurde durch die Zugabe von Hepatozytenmembranen mit einem Proteingehalt von 100 µg gestartet. Dann wurde 1 h bei 37 °C auf einer Wippe inkubiert. GF 52 Filter wurden kurz in Assaypuffer angefeuchtet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Membranen durch Vakuumfiltration über GF 52 Filter filtriert und dreimal mit 5 ml eiskaltem Assaypuffer gewaschen. Die Filter wurden in einem γ-Zähler ausgezählt.

Assaypuffer

		Endkonzentration
Tris/HCl	25 ml 1M pH 7,5/l	25,0 mM
Rinderserumalbumin	1 g	0,1 %

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt und die Lösung bei 4 °C gelagert.

3.3.8 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde in 0,5 bis 2,5 µl Probe in einem Ansatz von 800 µl H₂O und 200 µl Reagenz bestimmt. Nach der Zugabe des Bradford-Reagenzes wurde der Ansatz gut gemischt, mindestens 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei einer OD von 595 nm gemessen.

Mit Rinderserumalbumin wurde eine lineare Eichgerade von 0 bis 7,5 µg Protein erstellt.

Ansatz für die Proteinbestimmung :

Gesamtproteinlösung	0,5 bis 2,5 µl
oder Stammlösung BSA (1 µg/µl)	2,5; 5 ; 7,5 µl
H ₂ O	800 µl
Bradford-Reagenz	200 µl

Bradford-Reagenz:

Serva Blau (No. 35050)	100 mg
Ethanol (95%)	50 ml
Phosphorsäure (85%)	100 ml
ad 1 l mit H ₂ O	

3.3.9 Luciferase-Nachweis

Der verwendete Luciferase Assay Kit der Firma Boehringer/Mannheim ermöglicht den Nachweis von Luciferase aus der nordamerikanischen Feuerfliege (*Photinus pyralis*) in transfizierten Zellen. Dabei wird Luciferin in Gegenwart von ATP, Luftsauerstoff und Magnesiumionen durch die Luciferaseeinwirkung oxidiert. Diese Reaktion liefert Licht der Wellenlänge von 562 nm. Die Lichtintensität kann mit einem Luminometer gemessen werden.

Es wurden 1×10^6 Hepatozyten auf den Kulturplatten ($\varnothing = 60$ mm) in 300 μ l Lysispuffer 15 min lysiert. Die Zellen wurden in diesem Lysispuffer abgeschabt und in ein Mikrozentrifugationsgefäß überführt und 15 s gut gemischt. Nach Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 15.800 g wurde das Sediment verworfen und der Überstand in ein neues Mikrozentrifugationsgefäß pipettiert.

20 μ l des Überstandes aus den transfizierten Zellen wurden im Luminometer (Auto Lumat LB 953, Berthold/Pforzheim) automatisch mit 100 μ l Luciferase Assay Reagenz versetzt. Die gemessene Intervallzeit betrug 3×1 s. Vom Hersteller wurden keine Angaben über die Zusammensetzung der Puffer- und Substratlösung gemacht.

3.4 Sicherheitsmaßnahmen

Die Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen und Plasmid-DNA wurden gemäß dem Gentechnikgesetz von 1990 und den Richtlinien der Gentechnik-Sicherheitsverordnung von 1990 durchgeführt. Mit Bakterien kontaminierte Gegenstände wurden mit Wasserstoffperoxid und Seifenlauge behandelt und anschließend sterilisiert.

Die Chemikalien Formaldehyd, DEPC, Phenol und Ethidiumbromid gelten als karzinogen und wurden dementsprechend vorsichtig gehandhabt und entsorgt.

Die Arbeiten mit Radiochemikalien wurden ausschließlich in einem C-Labor durchgeführt, die Radiochemikalien wurden entsprechend den Auflagen entsorgt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Hemmung der zellulären Glucagonwirkungskette durch Interleukin 6

In kultivierten Rattenhepatozyten verminderte IL6 die durch Glucagon induzierte cAMP-Bildung entweder vor oder auf der Ebene des stimulatorischen G-Proteins, G_s . IL6 hemmte auch die cAMP-vermittelte PCK1-Genexpression (Christ et al., 1994 und 1997). Der molekulare Mechanismus der Hemmung der Glucagonwirkung wurde im Vergleich zu dem β -Agonisten Isoproterenol untersucht, der ebenfalls über einen 7TM-Rezeptor an ein stimulatorisches G-Protein gekoppelt ist und somit wie Glucagon intrazellulär die gleiche Signalkaskade auslöst. Die Wirkung von IL6 auf die glucagon- oder isoproterenol-stimulierte PCK1-Genexpression, die cAMP-Bildung und die Glucosefreisetzung wurde in kultivierten Rattenhepatozyten bestimmt. Die Wirkung auf die Glucosefreisetzung wurde des weiteren in der isoliert perfundierten Rattenleber untersucht. Glucagon-Rezeptor-Bindungsstudien wurden mit isolierten Membranen aus kultivierten Rattenhepatozyten durchgeführt.

4.1.1 Hemmung der glucagon-stimulierten PCK1-Genexpression durch IL6 in kultivierten Rattenhepatozyten

In kultivierten Rattenhepatozyten hemmte IL6 den glucagon-stimulierten PCK1-mRNA-Anstieg u.a. durch die Hemmung des Anstiegs an intrazellulärem cAMP (Christ et al., 1997). Da cAMP auch durch die Wirkung des β -adrenergen Rezeptors erhöht wird, sollte untersucht werden, ob die PCK1-Genexpression in kultivierten Rattenhepatozyten durch den β -Rezeptoragonisten Isoproterenol stimuliert wird und ob diese Stimulation durch IL6 hemmbar ist.

Die Hepatozyten wurden über einen Zeitraum von 48 h kultiviert. Dann zweimal mit insulinfreiem Medium gewaschen und anschließend in frischem Medium mit den in den Legenden angegebenen Hormon- und Cytokinkonzentrationen zwei weitere Stunden kultiviert. In einer Versuchsreihe wurden die Hepatozyten ausschließlich mit unterschiedlichen Konzentrationen an Glucagon bzw. Isoproterenol stimuliert, in einer weiteren Reihe wurden die Hepatozyten mit Glucagon bzw. Isoproterenol sowie zusätzlich mit 100 ng/ml IL6 behandelt.

Der Anstieg der PCK1-mRNA wurde bei einer Glucagonkonzentration von 5 nM maximal gesteigert. Bei Glucagonkonzentrationen von 0,5 nM wurden 65 %, bei 1 nM Glucagon 75 % des maximal stimulierten PCK1-mRNA-Anstiegs erreicht. Die halbmaximal wirksame Glucagonkonzentration lag bei 0,1 nM. Während IL6 den durch 5 nM und 1 nM Glucagon maximal gesteigerten PCK1-mRNA-Anstieg nur um ca. 25 % hemmte, betrug die Hemmung bei 0,1 nM und 0,5 nM 65 % bzw. 40 % (Abb. 11A).

Die PCK1-mRNA-Spiegel wurden durch 10 μ M (10 000 nM) Isoproterenol maximal gesteigert. Isoproterenolkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1 μ M (1000 nM) steigerten die PCK1-Genexpression um 15 %, um 25 %, um 40 % bzw. um 60 % des Maximalwertes. IL6 hemmte den durch 10 μ M Isoproterenol maximal stimulierten PCK1-mRNA-Anstieg um 55%. Bei 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1 μ M stieg die PCK1-mRNA in Gegenwart von IL6 nur noch um 5 %, um 10 %, um 18 % bzw. um 16 % an (Abb. 11B).

Damit hemmte IL6 sowohl den durch Glucagon als auch den durch Isoproterenol stimulierten PCK1-mRNA-Anstieg. Dies könnte auf einen gemeinsamen Angriffspunkt des IL6 bei der Hemmung der PCK1-Genexpression hindeuten, z.B. Hemmung der cAMP-Bildung.

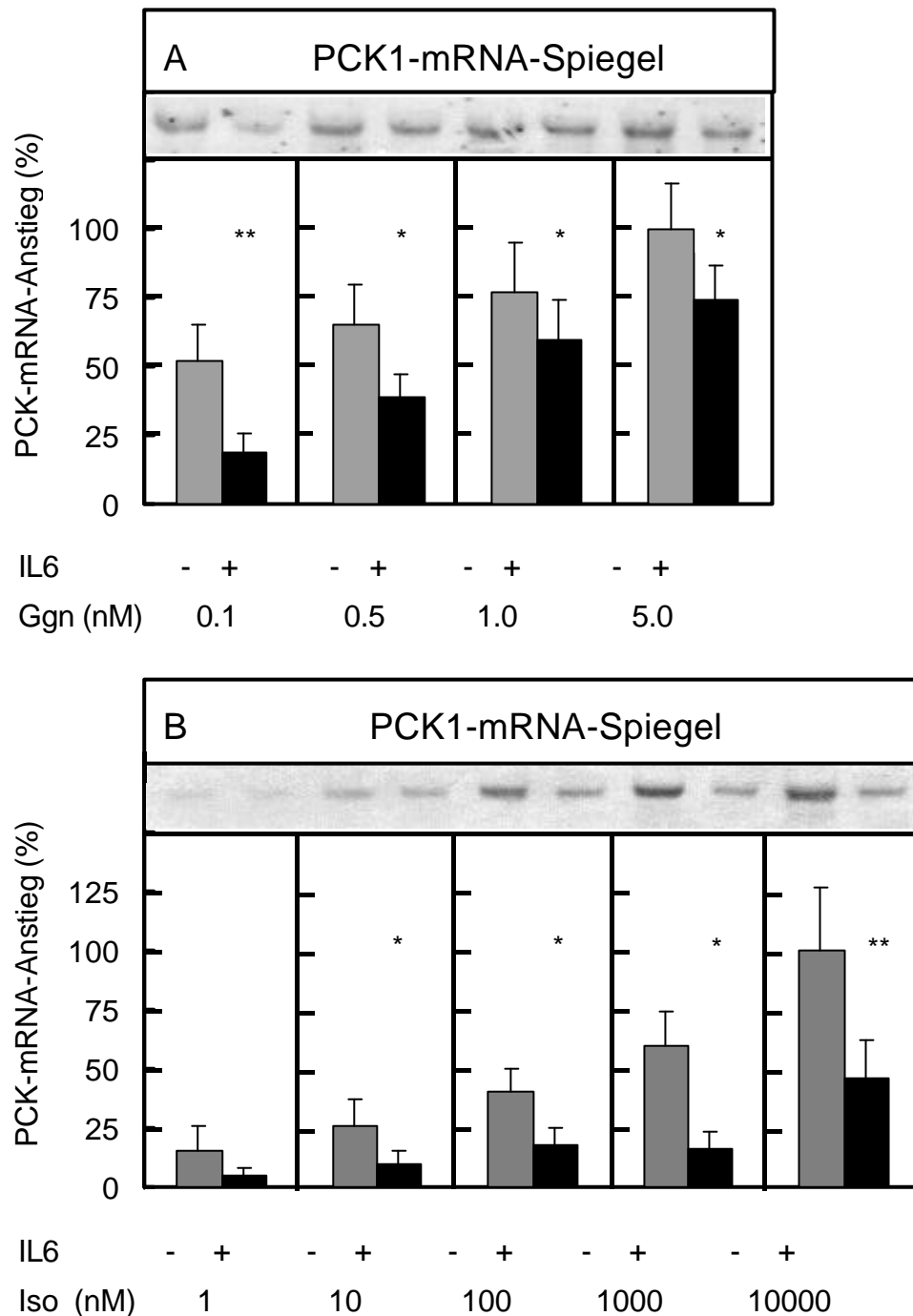


Abb. 11: Hemmung des (A) glucagon- und des (B) isoproterenol-stimulierten PCK1-mRNA-Anstiegs durch IL6 in primär kultivierten Rattenhepatozyten. Rattenhepatozyten wurden auf Kulturplatten (\varnothing : 60 mm) 48 h angezogen. Vor Versuchsbeginn wurden die Hepatozyten zweimal mit insulinfreiem, aber dexamethasonhaltigem Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 2 h mit den angegebenen Konzentrationen an Glucagon (A) oder Isoproterenol (B) in An- und Abwesenheit von 100 ng/ml IL6 stimuliert. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Gesamt-RNA für die Northern-Blot Analyse der PCK1-mRNA isoliert. In jedem Experiment wurde die durch 5 nM Glucagon (A) oder durch 10 μ M Isoproterenol (B) maximale Erhöhung der PCK1-mRNA gleich 100 % gesetzt. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM von 4 (A) bzw. 3-4 (B) unabhängigen Experimenten dar. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$ versus ohne IL6.

4.1.2 Hemmung der glucagon-stimulierten cAMP-Bildung durch IL6 in kultivierten Rattenhepatozyten

Sowohl Glucagon als auch der β -Agonist Isoproterenol aktivieren nach Bindung an ihren Transmembran-Rezeptor und Kopplung an ein stimulatorisches G-Protein die Adenylatcyclase. Dies führt in beiden Fällen zum Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentrationen. Da IL6 den durch Glucagon oder Isoproterenol stimulierten PCK-mRNA-Anstieg hemmte, sollte untersucht werden, ob IL6 auch den durch die Agonisten stimulierten cAMP-Anstieg hemmte.

Über einen Zeitraum von 48 h wurden die Hepatozyten kultiviert. Dann wurden sie zweimal mit insulinfreiem Medium gewaschen und 10 min im Inkubationsmedium äquilibriert. In einer Versuchsreihe wurden die Hepatozyten ausschließlich mit unterschiedlichen Konzentrationen an Glucagon bzw. Isoproterenol 3 min stimuliert. In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Hepatozyten mit Glucagon bzw. Isoproterenol und gleichzeitig jeweils mit 100 ng/ml IL6 behandelt.

1 nM Glucagon erhöhte die basalen cAMP-Spiegel mehr als 4fach. 0,1 nM Glucagon steigerte die cAMP-Werte 2fach und 0,5 nM Glucagon 3fach. Die halbmaximal wirksame Glucagonkonzentration wurde anhand einer doppelt reziproken Auftragung in grober Näherung mit 0,3 nM bestimmt. In Gegenwart von 100 ng/ml IL6 wurde die cAMP-Bildung bei Stimulation mit 0,1 nM Glucagon um 70 % und bei Stimulation mit 0,5 nM Glucagon um 60 % gehemmt. Bei 1 nM Glucagon war der maximale Anstieg in Gegenwart von 100 ng/ml IL6 dagegen nur noch um 30 % reduziert. Die halbmaximal wirksame Glucagonkonzentration wurde mit 0,9 nM bestimmt und war somit 3fach erhöht (Abb. 12A, 13A).

1000 nM Isoproterenol steigerte die basalen cAMP-Werte 8fach. 1, 10 und 100 nM Isoproterenol stimulierte die cAMP-Bildung 1,5fach, 3fach und 5fach. IL6 hemmte den isoproterenol-stimulierten cAMP-Anstieg nicht (Abb. 12B, 13B).

IL6 hemmte also den glucagon-, nicht aber den isoproterenol-stimulierten cAMP-Anstieg. Da Glucagon und Isoproterenol ihre Wirkung auf den cAMP-Anstieg über die Kopplung an das stimulatorische G-Protein bewirken, kann man vermuten, daß IL6 den glucagon-stimulierten cAMP-Anstieg entweder auf der Stufe des Glucagon-Rezeptors oder aber bei der Kopplung an das stimulatorische G-Protein hemmte.

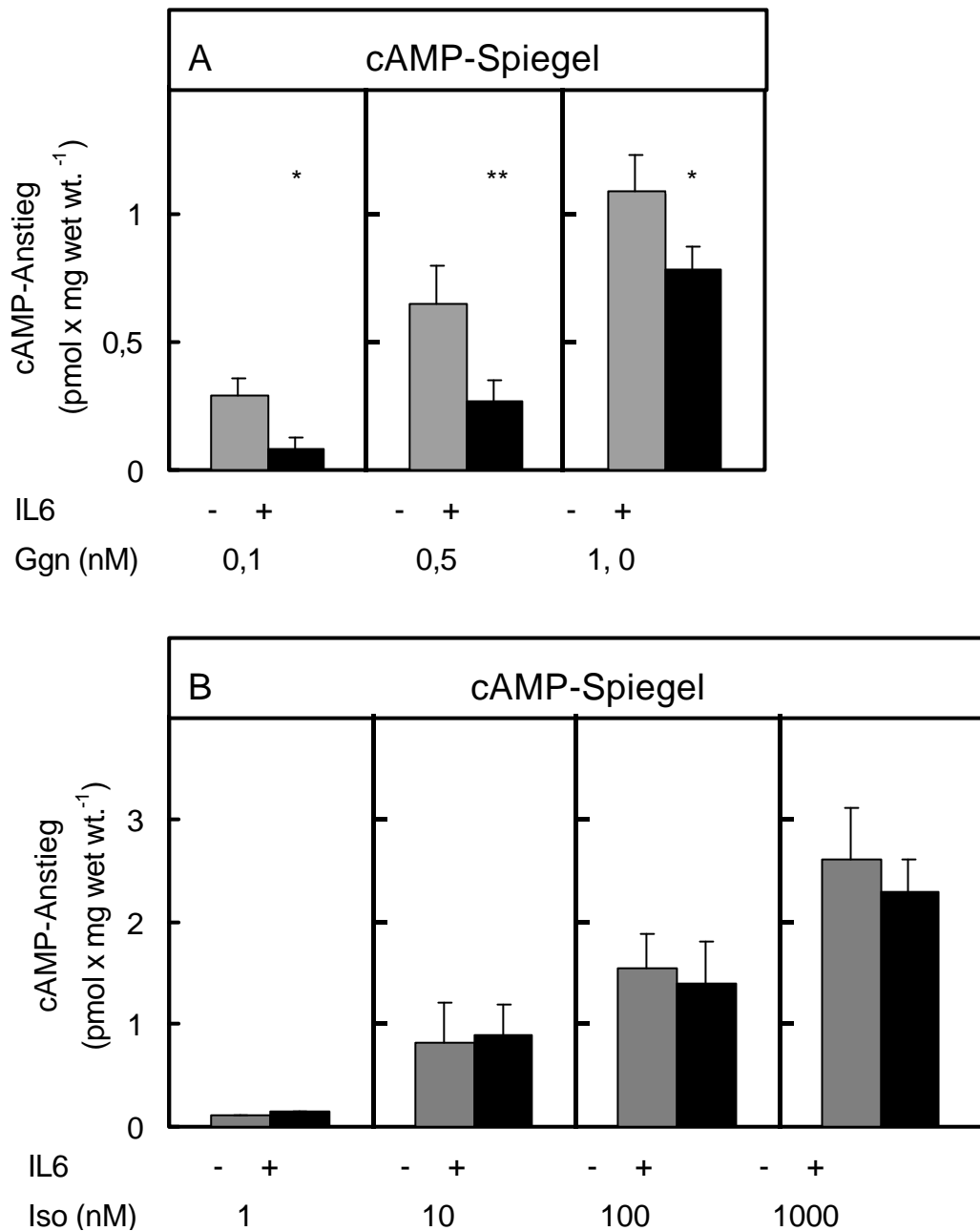


Abb. 12: Hemmung des glucagon-stimulierten cAMP-Anstiegs durch IL6 (A), nicht aber des isoproterenol-stimulierten cAMP-Anstiegs (B) in primär kultivierten Rattenhepatozyten. Rattenhepatozyten wurden auf Kulturplatten (\varnothing : 35 mm) 48 h kultiviert, anschließend zweimal mit Puffer A gewaschen und in diesem Puffer 10 min äquilibriert. Die Hepatozyten wurden 3 min mit den angegebenen Glucagon- oder Isoproterenolkonzentrationen in An- und Abwesenheit von 100 ng/ml IL6 stimuliert. Der Kulturüberstand wurde entfernt und die cAMP-Konzentration mit Hilfe eines RIAs nach Homogenisierung der Zellen im Zellüberstand bestimmt. Der Anstieg der cAMP-Konzentrationen wurde aus der Differenz der cAMP-Mengen nach 3 min Stimulation mit Glucagon oder Isoproterenol und den basalen nicht-stimulierten Werten berechnet. Diese lagen bei $0,33 \pm 0,05$ pmol x mg wet wt.⁻¹ bzw. $0,37 \pm 0,05$ pmol x mg wet wt.⁻¹. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung dar. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte; *: $p \leq 0,05$ versus ohne IL6, **: $p \leq 0,01$ versus ohne IL6.

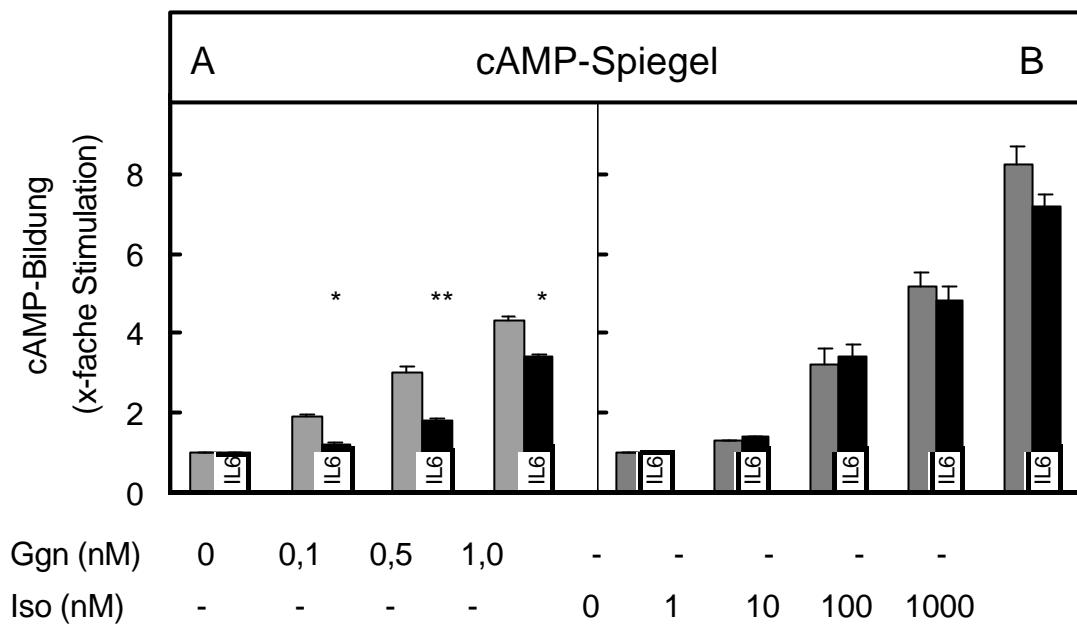


Abb. 13: Stimulation der cAMP-Bildung durch Glucagon (A) und Isoproterenol (B) in An- und Abwesenheit von IL6 in primär kultivierten Rattenhepatozyten. Versuchsbedingungen wie in Abb. 12 beschrieben. Die Stimulation der glucagon- und isoproterenol-induzierten cAMP-Bildung in An- und Abwesenheit von 100 ng/ml IL6 bezieht sich hier immer auf die Basalwerte. Die basalen Werte wurden gleich 1 gesetzt. Die anderen Werte sind dazu relativ. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung dar. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte; *: $p \leq 0,05$ versus ohne IL6, **: $p \leq 0,01$ versus ohne IL6.

4.1.3 Hemmung der glucagon-stimulierten Glucose-Freisetzung durch IL6 in kultivierten Rattenhepatozyten

Sowohl Glucagon als auch Isoproterenol erhöhen die hepatische Glucose-Freisetzung u.a. durch die Stimulation der Glykogenolyse infolge intrazellulär erhöhter cAMP-Konzentrationen. Da IL6 zwar den glucagon- nicht aber den isoproterenol-stimulierten cAMP-Anstieg hemmte, sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob IL6 auch funktionelle Unterschiede in der glucagon- und der isoproterenol-stimulierten Glucose-Freisetzung aus Glykogen bewirkte.

Die Hepatozyten wurden über einen Zeitraum von 48 h kultiviert, wobei nach 24 h dem Medium radioaktiv markierte Glucose zugesetzt wurde. Diese wurde in den folgenden 24 h in die zellulären Glykogenspeicher eingebaut. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen zweimal mit insulinfreiem, aber dexamethason- und lactathaltigem (2 mM) Medium gewaschen. Die Hepatozyten wurden in frischem Medium mit den angegebenen Hormon- und Cytokinkonzentrationen eine weitere Stunde kultiviert. Die Glucose-Freisetzung aus Glykogen wurde aus der Menge der abgegebenen radioaktiven Glucose berechnet.

Die Glucose-Freisetzung wurde in einer ersten Versuchsreihe durch unterschiedliche Glucagonkonzentrationen und in einem parallelen Ansatz gleichzeitig mit Glucagon und 100 ng/ml IL6 stimuliert. Innerhalb der einstündigen Inkubationsdauer verlief die Glucose-Freisetzung linear (Daten nicht gezeigt). Die Glucose-Freisetzung wurde konzentrationsabhängig durch Glucagon stimuliert. Bei einer Glucagonkonzentration von 0,1 nM wurde die Glucose-Freisetzung 1,9fach, bei 1 nM 2,2fach und bei 10 nM um das 2,4fache über den Basalwert gesteigert. Bei einer gleichzeitigen Inkubation mit IL6 wurde die basale Glucose-Freisetzung bei den o.g. Glucagonkonzentrationen nur noch 1,4fach, 1,8fach und 2fach gesteigert. Das entspricht einer Hemmung von 65 % bei einer Stimulation mit 0,1 nM, von 55 % bei 1 nM und von 50 % bei 10 nM Glucagon (Abb. 14A, 15A). Anhand einer doppelt reziproken Auftragung wurde in grober Näherung bestimmt, daß IL6 die halbmaximal wirksame Glucagonkonzentration von 0,05 nM auf 0,1 nM erhöhte (diese Daten wurden freundlicherweise von B. Christ überlassen).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Glucose-Freisetzung durch Isoproterenol und parallel dazu mit Isoproterenol und IL6 untersucht. Die Glucose-Freisetzung wurde konzentrationsabhängig durch Isoproterenol stimuliert. 100 nM Isoproterenol steigerte die Glucose-Freisetzung 1,6fach und 1000 nM Isoproterenol 1,8fach über den Basalwert (Abb. 14B, 15B).

IL6 hatte keinen Einfluß auf die isoproterenol-stimulierte Glucose-Freisetzung, während es die glucagon-stimulierte Glucose-Freisetzung signifikant hemmte. Daraus kann geschlossen werden, daß die Hemmung des glucagon-stimulierten cAMP-Anstieges durch IL6 (Abb. 12A, 13A) die Hemmung der glucagon-stimulierten Glucose-Abgabe zur Folge hatte. IL6 bewirkte also die funktionelle Inaktivierung der Glucagonwirkung, nicht aber die der Isoproterenolwirkung auf die Glykogenolyse.

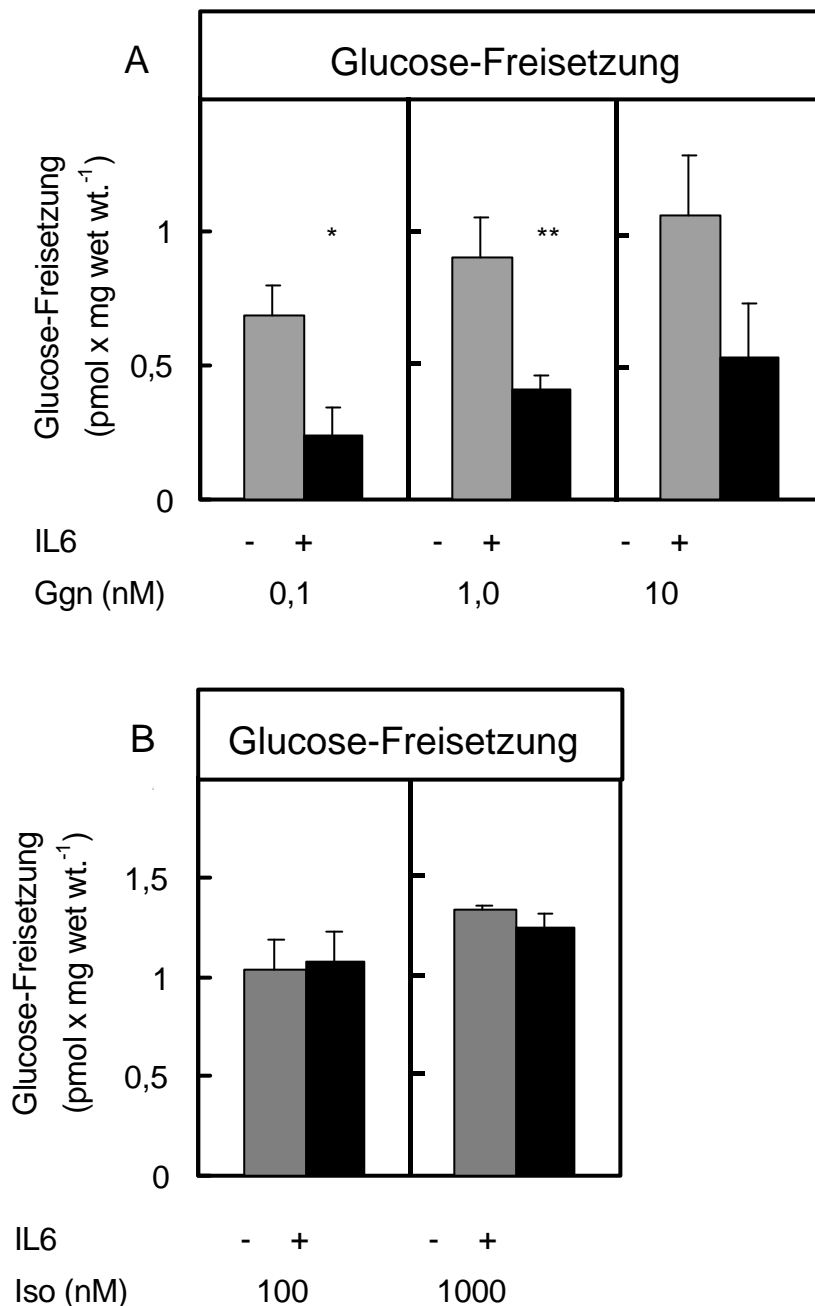


Abb. 14: Hemmung der glucagon-stimulierten Glucose-Freisetzung durch IL6 (A), nicht aber der isoproterenol-stimulierten Glucose-Freisetzung (B) in primär kultivierten Rattenhepatozyten. Rattenhepatozyten wurden auf Kulturplatten (\varnothing : 60 mm) 24 h angezogen. Dann wurde das Medium mit 15 μ l (0,111 MBq)/ml U-¹⁴C-Glucose versetzt und die Zellen weitere 24 h kultiviert. Vor Versuchsbeginn wurden die Hepatozyten zweimal mit insulinfreiem, aber dexamethason- und lactathaltigem (2 mM) Medium gewaschen. Dann wurden die Zellen 60 min mit den angegebenen Konzentrationen an Glucagon oder Isoproterenol in An- und Abwesenheit von 100 ng/ml IL6 stimuliert. Je 100 μ l Überstand wurden auf eine Dowex-Formiat-Säule aufgetragen, die radioaktive Glucose mit 2 ml H₂O eluiert und mit 5 ml Scintillations-Cocktail gemischt. Die neu synthetisierte Glucose ließ sich aus der Differenz der radioaktiven Proben zum Zeitpunkt 60 min und dem Nullwert, geteilt durch die spezifische Radioaktivität der Glucose, die im Markierungszeitraum im Medium vorlag, errechnen. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM von 5-8 (A) bzw. 3 (B) unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung dar. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte; *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,025$ versus ohne IL6.

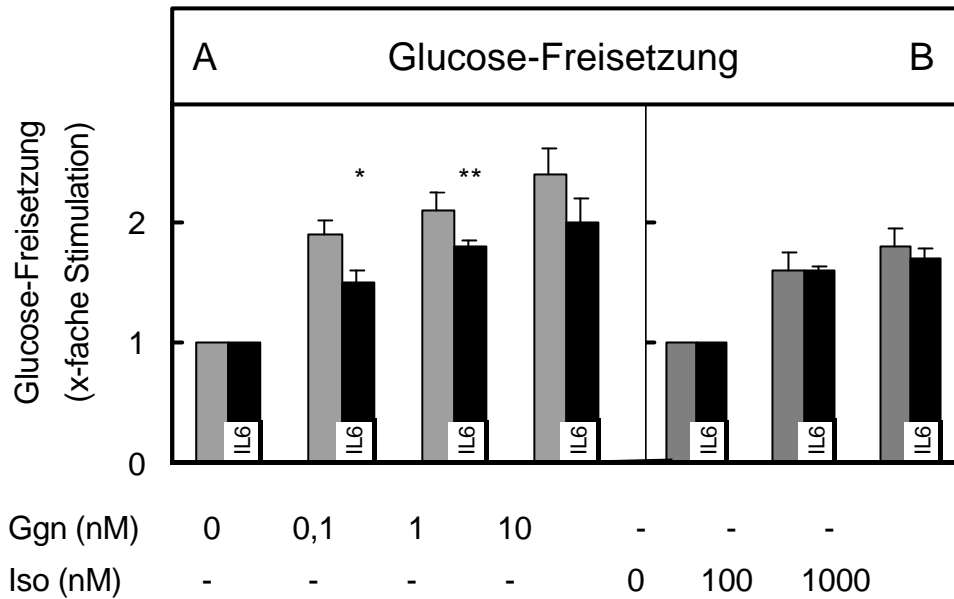


Abb. 15: Stimulation der Glucose-Freisetzung durch Glucagon (A) und Isoproterenol (B) in An- und Abwesenheit von IL6 in primär kultivierten Rattenhepa-tozyten. Versuchsbedingungen wie in Abb. 14 beschrieben. Die Stimulation der glucagon- und isoproterenol-induzierten Glucose-Freisetzung in An- und Abwesenheit von 100 ng/ml IL6 bezieht sich hier immer auf die Basalwerte. Die basalen Werte wurden gleich 1 gesetzt. Alle anderen Werte sind dazu relativ. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM von 5-8 (A) bzw. 3 (B) unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung dar. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte; *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,025$ versus ohne IL6.

4.1.4 Hemmung der glucagon-stimulierten Glucose-Freisetzung durch IL6 in der isolierten, nicht-rezirkulierend perfundierten Rattenleber

Die funktionelle Inaktivierung der Glucagonwirkung durch IL6 im Vergleich zur Isoproterenolwirkung sollte auch im Modell der Glucose-Freisetzung in der isolierten Leberperfusion gezeigt werden.

Die Rattenleber wurde *in situ*, nicht-rezirkulierend in der 11.-12. Minute mit Isoproterenol und in der 41.-42. Minute mit Glucagon über die Portalvene stimuliert. Im Vergleich dazu wurden Isoproterenol oder Glucagon zusammen mit 100 ng/ml IL6 portal infundiert. IL6 wurde von der 6.-12. und von der 36.-42. Minute appliziert.

Glucagon wurde mit einer halbmaximal wirksamen Konzentration von 0,1 nM (Stümpel et al., 1998) portal infundiert. Diese portale Glucagoninfusion erhöhte die basale Glucose-Freisetzung in der 44. Minute 5fach (Abb. 16A). Die gesamte Glucose-Freisetzung wurde auch als Fläche unter der Kurve (AUC) mit $109,5 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$ bestimmt. Eine zusätzliche Infusion von 100 ng/ml IL6 hemmte die glucagon-induzierte hepatische Glucose-Freisetzung nahezu vollständig. Die korrespondierende Fläche unter der Kurve betrug nur noch $14,2 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$ (Abb. 16B).

Isoproterenol wurde bei einer halbmaximal wirksamen Konzentration von 500 nM (Ulken et al., 1991) in die Portalvene infundiert. Die Glucose-Freisetzung wurde 2fach gesteigert. Das entspricht einer Fläche unter der Kurve von $54,3 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$. Die zusätzliche Infusion von 100 ng/ml IL6 hatte keinen Einfluß auf die isoproterenol-induzierte hepatische Glucose-Freisetzung (Abb. 16A). Sie ließ sich weiterhin 2fach steigern, das entspricht einer Fläche unter der Kurve von $52,3 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$ (Abb. 16B).

Die Befunde bestätigen also die Daten in kultivierten Rattenhepatozyten, daß IL6 die durch Glucagon, nicht aber die durch Isoproterenol stimulierte hepatische Glucose-Freisetzung aus Glykogen hemmt. Da beide Agonisten identische intrazelluläre Signalwege benutzen, könnte IL6 die Hemmung der Glucagonwirkung z.B auf der Ebene des Glucagon-Rezeptors bewirken.

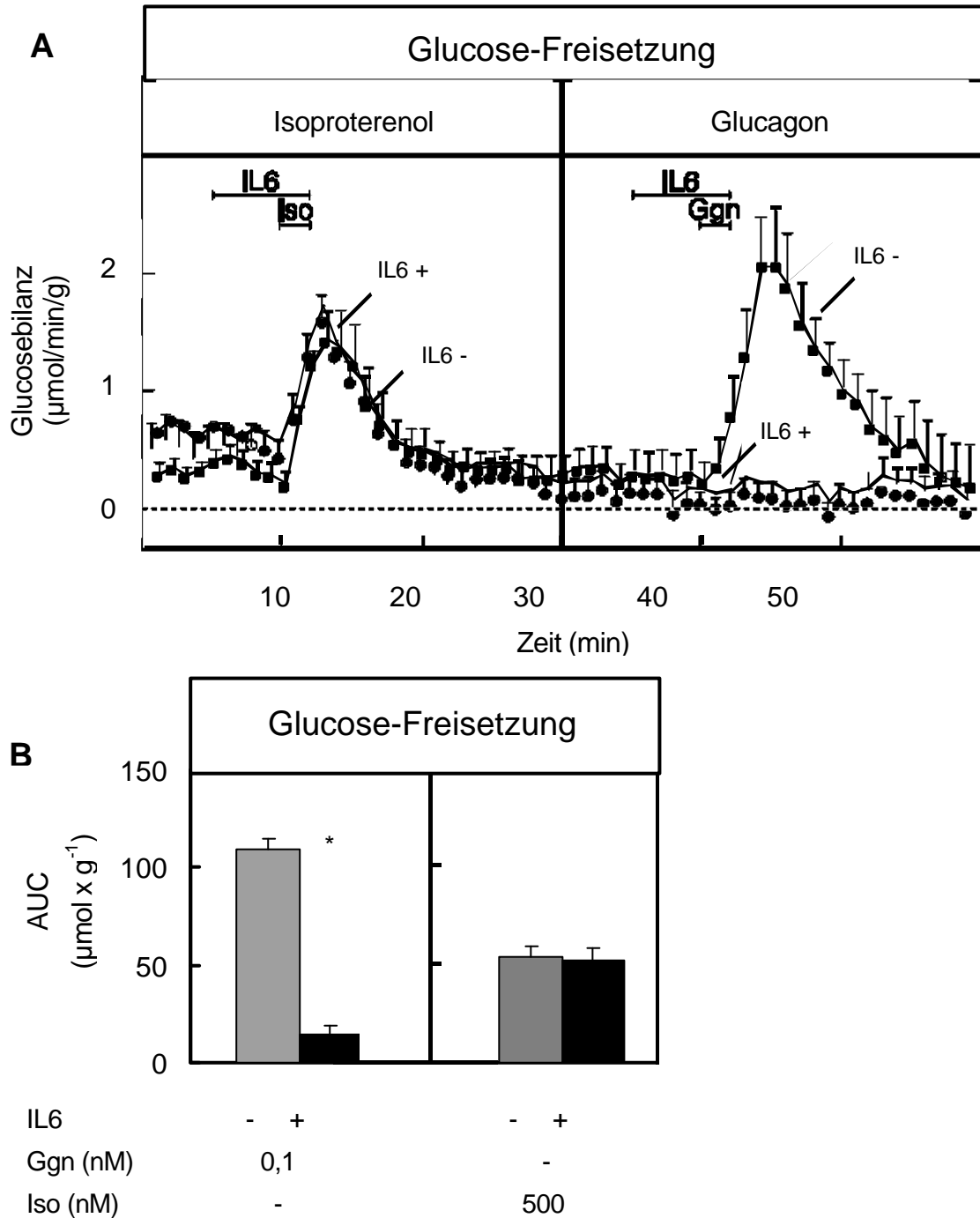


Abb. 16: Hemmung der glucagon-, nicht aber der isoproterenol-stimulierten Glucose-Bildung durch IL6 in der isoliert perfundierten Rattenleber. Die Leber wurde *in situ* nicht-rezirkulierend über die Portalvene (Venae portae, VP) mit einem Krebs-Ringer-Puffer, der 5 mmol/l Glucose, 2 mmol/l Lactat, 0,2 mmol/l Pyruvat und 0,5 % BSA enthielt, perfundiert. Isoproterenol (500 nmol/l, 11.-12. min) und Glucagon (0,1 nmol/l, 41.-42. min) wurden in An- und Abwesenheit von 100 ng/ml IL6 (6.-12. und 36.-42. min) über die VP infundiert. A zeigt die Glucosebilanz ($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$) aus der Differenz zwischen der Glucosekonzentration in der IVC und der Konzentration in der VP, multipliziert mit den Flußraten und dem Organgewicht. Positive Werte geben eine Glucose-Freisetzung, negative Werte eine Glucoseaufnahme wieder. B stellt die gesamte Glucose-Freisetzung ($\mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$) aus der Fläche unter der Kurve (AUC) dar und entspricht der Glucosebilanz multipliziert mit der Zeit. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von je 4 Experimenten. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte; *: $p \leq 0,05$ versus ohne IL6.

4.1.5 Etablierung eines Bindungsassays für den Glucagon-Rezeptor in primär kultivierten Rattenhepatozyten

In kultivierten Rattenhepatozyten hemmte IL6 zwar den glucagon- aber nicht den isoproterenol-stimulierten cAMP-Anstieg und infolge dessen auch die Glucose-Freisetzung (Abb. 12, 14). Ein möglicher Angriffspunkt könnte der Glucagon-Rezeptor sein.

In der Literatur sind bisher Glucagon-Rezeptor-Bindungsstudien an Membranen aus Rattenleber, aus Hepatozytensuspensionen und aus transfizierten COS-1 Zellen beschrieben (Pohl, 1976; Horwitz et al., 1985; Unson et al., 1995), nicht jedoch aus kultivierten Rattenhepatozyten. Daher wurde ein Glucagon-Rezeptor-Bindungsassay mit Membranen aus kultivierten Rattenhepatozyten etabliert.

Die Hepatozyten wurden in allen Experimenten über einen Zeitraum von 48 h kultiviert, wobei das Kulturmedium jeweils nach 4 und 24 h erneuert wurde. Vor Beginn des Experiments wurden die Hepatozyten zweimal mit insulinfreiem Medium gewaschen, anschließend mit 0,1 nM Glucagon mit und ohne 100 ng/ml IL6 stimuliert und sofort in N_2 eingefroren. Die Membranen wurden in Anlehnung an eine von Neuschäfer-Rube et al. (1993) für Prostanoidrezeptoren etablierte Methode aufgearbeitet. Die Hepatozyten wurden in einem Homogenisierungspuffer mit einem hohen Saccharosegehalt hyperton und anschließend mechanisch in einem Glashomogenisator aufgeschlossen. Nach einem Ultrazentrifugationsschritt ($100.000 \times g$) wurde das Sediment mit allen Membranproteinen in einem Bindungspuffer aufgenommen, dessen pH-Wert abweichend von o.g. Methode auf 7,4 eingestellt wurde. Das pH-Optimum für die Bindung zwischen Rezeptor und Ligand liegt zwischen 6,9 und 7,5 (Hoosein et al., 1984). Der Bindungsassay wurde mit jeweils frisch isolierten Membranen in einem Assaypuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,4; 1 % BSA) in Gegenwart von 0,5 nM J^{125} -Glucagon in einem Gesamtvolumen von 100 μl angesetzt (Unson et al., 1996). Anschließend wurden die Ansätze 1 h bei 37° C auf einer Wippe inkubiert (Horwitz et al., 1985). Die Inkubation wurde beendet, indem freie von membrangebundener Radioaktivität über eine Vakuumfiltration getrennt wurden. Die membrangebundene Radioaktivität wurde in einem γ -Counter gemessen.

Bindung von J^{125} -Glucagon an den Glucagon-Rezeptor in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge

Die lineare Abhängigkeit zwischen Proteinmenge und Ligandbindung ist in der Literatur mit 10-50 μg Membranprotein angegeben (Pohl, 1976; Unson et al., 1996). Diese Menge ergab jedoch an primär kultivierten Rattenhepatozyten keine nachweisbare Bindung, so daß zunächst die benötigte Proteinmenge bestimmt wurde.

Die signifikante Hemmung der Glucagonwirkung wurde in allen Versuchen bei einer Glucagonkonzentration von 0,1 nM beobachtet. Da der cAMP-Anstieg bei dieser

Konzentration ein Maximum nach 3 min erreichte (Christ et al., 1997), und der Glucagon-Rezeptor der intrazellulären cAMP-Bildung vorgeschaltet ist, wurden kultivierte Rattenhepatozyten 1,5 min mit 0,1 nM Glucagon stimuliert und anschließend die Membranen isoliert. In einem einmaligen Experiment wurde die Bindung von J^{125} -Glucagon in Abhängigkeit zur eingesetzten Proteinmenge untersucht. Die totale Bindung wurde mit 0,5 nM J^{125} -Glucagon, die unspezifische Bindung in Gegenwart eines 10 000fachen Überschusses (5 μ M) an nicht-markiertem Glucagon für jede Proteinmenge bestimmt, so daß sich die spezifische Bindung aus der Differenz zwischen totaler und unspezifischer Bindung errechnete.

Zwischen 0 und 200 μ g Gesamtprotein ergab sich ein annähernd linearer Anstieg der Glucagonbindung. Darüberhinaus waren Proteinmengen und Bindung nicht mehr proportional; die Bindung von J^{125} -Glucagon konnte durch die Erhöhung der Gesamtproteinmenge nur noch minimal gesteigert werden. Daher wurden alle Experimente mit 100 μ g Gesamtprotein durchgeführt (Abb. 17).

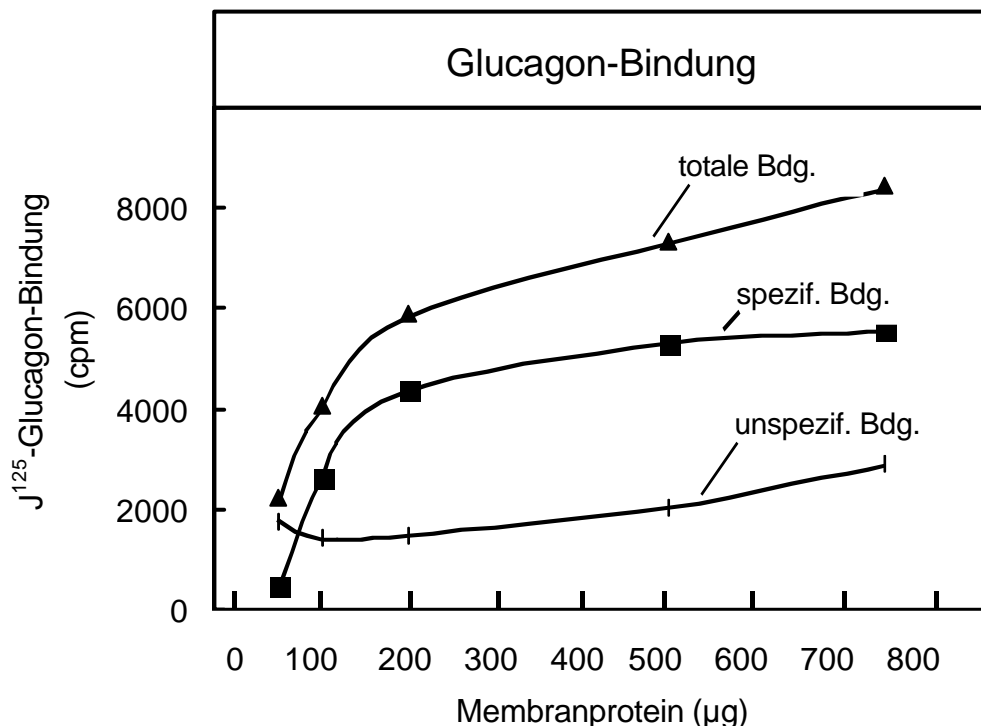


Abb. 17: Bindung von J^{125} -Glucagon an den Glucagon-Rezeptor in Abhängigkeit von der eingesetzten Gesamtproteinmenge. Rattenhepatozyten wurden auf Kulturplatten (\varnothing : 60 mm) 48 h kultiviert, anschließend zweimal mit insulin-freiem Medium gewaschen und dann 1,5 min mit 0,1 nM Glucagon stimuliert. Die Membranen wurden dann präpariert und steigende Gesamtproteinmengen in den Bindungsassay eingesetzt. In Gegenwart von 0,5 nM J^{125} -Glucagon wurde die totale Bindung bestimmt, die unspezifische Bindung in Gegenwart von 5 μ M Glucagon. Die Inkubation erfolgte 1 h bei 37 °C auf einer Wippe. Mittels Vakuumfiltration wurde freie von membrangebundener Radioaktivität getrennt. Die membrangebundene Radioaktivität wurde im γ -Counter gemessen (n=1), und die spezifische Bindung als Differenz zwischen totaler und unspezifischer Bindung berechnet.

4.1.6 Transiente Verminderung der J^{125} -Glucagonbindung an den Glucagon-Rezeptor durch IL6 in kultivierten Rattenhepatozyten

Die Stimulation primär kultivierter Rattenhepatozyten mit physiologischen Glucagonkonzentrationen von 0,1 nM steigerte die intrazellulären cAMP-Konzentrationen nach 3 min maximal (Püschel und Christ, 1994). 100 ng/ml IL6 hemmte diesen cAMP-Anstieg (Christ et al., 1997). In Analogie zu den Experimenten in dieser Arbeit, bei denen die durch 0,1 nM Glucagon stimulierte intrazelluläre Wirkung durch 100 ng/ml IL6 signifikant gehemmt wurde, wurden die Hepatozyten 30 s, 60 s und 180 s mit 0,1 nM Glucagon mit und ohne 100 ng/ml IL6 stimuliert. Diese Zeitpunkte wurden gewählt, um eventuelle kurzfristige Veränderungen am Glucagon-Rezeptor, die durch ein verändertes Bindungsverhalten erkennbar wären, zu erfassen. Membranen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten präpariert und jeweils 100 µg Gesamtprotein in den Bindungsassay eingesetzt.

Die Glucagonkonzentration, die benötigt wird, um 50 % des an den Rezeptor gebundenen radioaktiven Glucagons (K_D) zu verdrängen, liegt bei Membranen aus Rattenleber bei 1 nM (Unson et al., 1996). In transient mit dem Glucagonrezeptor transfizierten COS1-Zellen wurde eine K_D von 10 - 40 nM Glucagon ermittelt (Carruthers et al., 1994; Unson et al., 1996; Cypess et al., 1999). Die Bindung von J^{125} -Glucagon wurde in diesem Experiment in Gegenwart von 1,5 nM Glucagon untersucht.

Die Bindung von J^{125} -Glucagon an Hepatozytenmembranen war nach Glucagonstimulation der Zellen für 30 s zweifach und für 180 s dreifach erhöht. IL6 verminderte die J^{125} -Glucagonbindung nach 30 s um 75 %, nach 60 s um 45 % und hatte keinen Effekt mehr nach 180 s (Abb. 18). Demnach verminderte IL6 die J^{125} -Glucagonbindung an den Rezeptor transient mit maximaler Wirkung bei 30 s. Möglicherweise bewirkt IL6 eine kurzfristige, reversible kovalente Modifikation des Glucagon-Rezeptors, so daß nur noch eine verminderte Anzahl an Bindungsstellen zur Verfügung steht. Die Hepatozyten wurden deshalb in allen folgenden Experimenten mit den entsprechenden Hormon- bzw. Cytokinkonzentrationen für 30 s stimuliert.

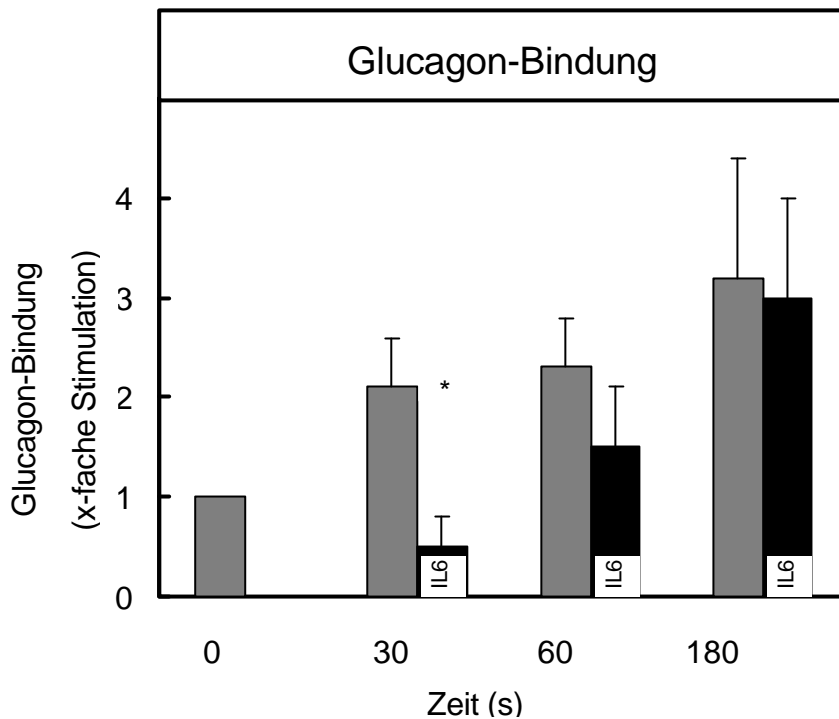


Abb. 18: Transiente Verminderung der Bindung von J^{125} -Glucagon an Membranen aus kultivierten Rattenhepatozyten durch IL6. Die Zellen wurden auf Kulturplatten (\varnothing : 60 mm) 48 h kultiviert, anschließend zweimal mit insulin-freiem Medium gewaschen und dann zu den angegebenen Zeitintervallen mit 0,1 nM Glucagon mit und ohne 100ng/ml IL6 stimuliert. Die Membranen wurden dann präpariert und jeweils 100 μ g Gesamtprotein in den Bindungsassay eingesetzt. In Gegenwart von 5 μ M Glucagon wurde die unspezifische Bindung bestimmt. Die Inkubation erfolgte mit 1,5 nM Glucagon (0,5 nM J^{125} -Glucagon und 1 nM nicht-markiertes Glucagon) 1 h bei 37 °C. Mittels Vakuumfiltration wurde die Inkubation beendet und freie von membrangebundener Radioaktivität getrennt. Die membrangebundene Radioaktivität wurde im γ -Counter gemessen. In jedem Experiment wurde die Radioaktivität der Hepatozyten zum Zeitpunkt 0 s gleich 1 gesetzt. Die anderen Werte sind dazu relativ. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SEM von je 3 Experimenten dar. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte; *: $p \leq 0,05$ versus ohne IL6.

4.1.7 Steigerung der Affinität des Glucagon-Rezeptors aus kultivierten Rattenhepatozyten zum Liganden durch IL6

Um zu untersuchen, ob die durch IL6 verminderte Glucagonbindung 30 s nach Glucagongabe auf eine Änderung der Dissoziationskonstanten (K_D) zurückzuführen war, wurden kultivierte Rattenhepatozyten für 30 s mit 0,1 nM Glucagon in Abwesenheit oder Gegenwart von 100 ng/ml IL6 stimuliert und anschließend Membranen aus den Zellen isoliert. Zur Bestimmung der K_D wurden die Membranen mit steigenden Glucagonkonzentrationen (0,001 – 1000 nM) und 0,5 nM J^{125} -Glucagon 1 h bei 37 °C im kompetitiven Bindungsassay inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Vakuumfiltration beendet.

Die maximale Bindung von 0,5 nM J^{125} -Glucagon wurde durch 0,001 nM nicht-markiertes Glucagon erwartungsgemäß nicht vermindert. Die maximale Bindung war an Membranen, die aus mit IL6 behandelten Hepatozyten präpariert worden waren, um 33 % reduziert. Bei

1 nM nicht-markiertem Glucagon zeigten Membranen aus mit Glucagon und IL6 behandelten Hepatozyten gegenüber den Membranen aus nur mit Glucagon stimulierten Hepatozyten ein um 53 % reduziertes Bindungsvermögen. Bei 10 nM nicht-markiertem Glucagon war die Bindung an Membranen aus mit Glucagon und IL6 behandelten Hepatozyten um 95 % gegenüber Membranen aus nur mit Glucagon behandelten Hepatozyten reduziert (Abb. 19).

Die Bestimmung der K_D aus den Bindungskurven ergab 3,0 nM mit den Membranen aus nur mit Glucagon behandelten Hepatozyten und 0,5 nM mit den Membranen aus mit Glucagon und IL6 behandelten Hepatozyten. D.h., IL6 erhöhte die Affinität des Glucagons zum Rezeptor 6fach. Die Affinitätserhöhung vom Glucagon-Rezeptor zum Liganden könnte einhergehen mit einer erschwerten Dissoziation des Gs-Proteins, so daß die intrazelluläre cAMP-Bildung vermindert würde.

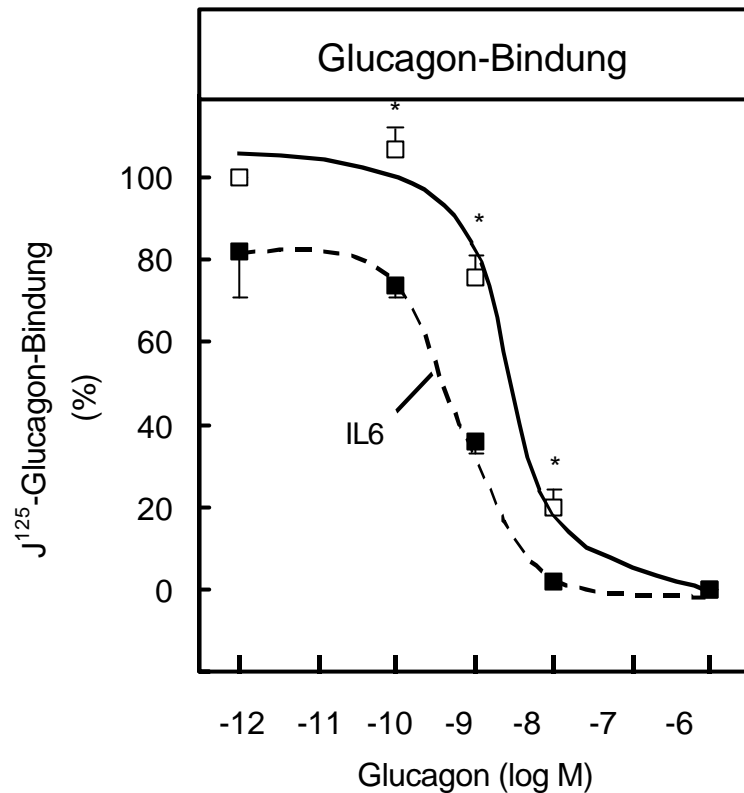


Abb. 19: Steigerung der Affinität von Glucagon zum Rezeptor an Membranen aus primär kultivierten Rattenhepatozyten durch IL6. Rattenhepatozyten wurden auf Kulturplatten (\varnothing : 60 mm) 48 h kultiviert, anschließend zweimal mit insulin-freiem Medium gewaschen und dann 30 s nur mit 0,1 nM Glucagon oder mit 0,1 nM Glucagon und IL6 gleichzeitig behandelt. Die Membranen wurden dann präpariert und jeweils 100 μ g Gesamtprotein in den Bindungsassay eingesetzt. In Gegenwart von 5 μ M Glucagon wurde die unspezifische Bindung bestimmt. Die Inkubation erfolgte mit 0,5 nM J¹²⁵-Glucagon und den angegebenen Konzentrationen an nicht-markiertem Glucagon 1 h bei 37 °C. Mittels Vakuumfiltration wurde die Inkubation beendet und freie von membran-gebundener Radioaktivität getrennt. Die membrangebundene Radioaktivität wurde im γ -Counter gemessen. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 5 μ M Glucagon bestimmt und von den Meßwerten abgezogen. In jedem Experiment wurde die Bindung von J¹²⁵-Glucagon bei 10⁻¹² nM Glucagon gleich 100 % gesetzt. Die anderen Werte sind dazu relativ. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SEM von je 4 unabhängigen Experimenten aus 4 verschiedenen Membranpräparationen dar. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte; *: $p \leq 0,01$ versus ohne IL6.

4.2 Regulation des Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-1-Gen-Promotors durch Interleukin 6

In der Rattenleber wird das Kontrollenzym der Gluconeogenese, die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, zu 90 % im Cytosol (PCK1) und zu 10 % in den Mitochondrien (PCK2) exprimiert (Ballard et al., 1969). Der Promotor des PCK1-Gens wird durch eine Vielzahl cis- und transaktivierender Faktoren reguliert. In der postresorptiven Phase stimuliert Glucagon über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP response element binding protein). Zusätzlich sind Faktoren der C/EBP-(CAAT-box enhancer binding protein) Familie wichtig für die basale und cAMP-stimulierte PCK1-Genexpression. Antagonist der Glucagonwirkung ist Insulin (Lemaigre et al., 1994; Hanson et al., 1997).

In kultivierten Rattenhepatozyten hemmte 100 ng/ml IL6 die Stimulation der PCK1-Genexpression durch 0,1 nM Glucagon auf 30 %; diese Wirkung könnte auf der Ebene der cAMP-Bildung und zusätzlich davon unabhängig am PCK1-Genpromotor direkt erfolgt sein (Christ et al., 1997). Im gleichen Zellsystem hemmte 100 ng/ml IL6 die durch 100 nM cAMP 1,6fach stimulierte Expression eines transfizierten Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle des PCK1-Genpromotors von -979 bis +32 bp (Christ et al., 1997). Der molekulare Mechanismus dieser Hemmung ist bisher unbekannt. Einerseits könnte IL6 durch eine reduzierte cAMP-Bildung die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB mindern, andererseits könnten auch IL6-aktivierte Transkriptionsfaktoren, z.B. C/EBP β , die PCK1-Genexpression inhibieren.

Deshalb sollten im PCK1-Genpromotor IL6-responsive Regionen charakterisiert werden. Luciferase-Reportergene unter der Kontrolle verschiedener trunkierter und mutierter PCK1-Genpromotoren sollten in kultivierte Rattenhepatozyten transfiziert und der Einfluß von IL6 auf die Glucagon- und CPT-cAMP-aktivierte PCK1-Genexpression untersucht werden.

4.2.1 Stimulation der Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle der Promotoren PCKprom-979/+32, PCKprom-1149/+32 und PCKprom-2500/+32 durch Glucagon; Einfluß von IL6

Bisher war der Mechanismus der IL6-Wirkung auf den PCK1-Promotor in Hepatozyten nur nach Transfektion eines PCK1-Luciferase Genkonstruktes, das den PCK1-Promotor von -979 bis +32bp enthielt, und nur unter Verwendung von CPT-cAMP als Stimulator untersucht worden. Jetzt sollte die IL6-Wirkung auf dieses und andere Konstrukte, zunächst unter Verwendung von Glucagon als Stimulator, analysiert werden.

Frisch isolierte Rattenhepatozyten wurden entweder mit dem Luciferase-Reportergenkonstrukt PCKprom-979/+32, dem Konstrukt PCKprom-1149/+32 oder dem Konstrukt PCKprom-2500/+32 transfiziert. Nach fünf Stunden wurde das Medium erneuert

und die Zellen über einen Zeitraum von 43 h kultiviert. Die Luciferaseaktivität wurde über 8 h mit Glucagonkonzentrationen von 0,5-5 nM mit und ohne 100 ng/ml IL6 induziert.

Die Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle des PCK1-Promotors von -979 bis +32 bp wurde mit 5 nM Glucagon 7,9fach über den basalen Wert stimuliert. Halbmaximal wirksame Glucagonkonzentration wurde bei 0,56 nM Glucagon erreicht. Bei gleichzeitiger Gabe von 100 ng/ml IL6 stimulierte 5 nM Glucagon die Expression des Luciferase-Reportergens maximal 6,5fach über den Basalwert. Die halbmaximal wirksame Glucagonkonzentration wurde bei 0,63 nM Glucagon erreicht. IL6 beeinflusste also weder die maximale Stimulation der Luciferaseexpression durch Glucagon, noch die halbmaximal wirksame Glucagonkonzentration (Abb. 20A).

Die Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle des PCK1-Promotors von -1149 bis +32 bp wurde bei 5 nM Glucagon 8fach über den basalen Wert stimuliert. Halbmaximal wirksame Glucagonkonzentration wurde bei 0,44 nM Glucagon erreicht. Bei gleichzeitiger Gabe von 100 ng/ml IL6 stimulierte 5 nM Glucagon die Expression des Luciferase-Reportergens ebenfalls maximal 8fach über den Basalwert. Auch hier lag die halbmaximal wirksame Glucagonkonzentration bei 0,44 nM Glucagon. Wieder wurden weder die maximale Stimulation der Luciferaseexpression, noch die halbmaximal wirksame Glucagonkonzentration wurden durch IL6 beeinflusst (Abb. 20B).

Unter der Kontrolle des PCK-Promotors von -2500 bis +32 bp wurde die Expression des Luciferase-Reportergens mit 5 nM Glucagon maximal 3fach über den basalen Wert stimuliert. Die halbmaximal wirksame Glucagonkonzentration wurde bei 0,18 nM Glucagon erreicht. Bei gleichzeitiger Gabe von 100 ng/ml IL6 stimulierte 5 nM Glucagon die Expression des Luciferase-Reportergens maximal 2,7fach über den Basalwert. Die halbmaximal wirksame Glucagonkonzentration wurde hier bei 0,2 nM Glucagon erreicht. Die maximale Stimulation der Luciferaseexpression durch Glucagon und die halbmaximal wirksamen Glucagonkonzentrationen wurden auch hier durch IL6 nicht beeinflusst (Abb. 20C).

Die Expression der transfizierten PCK1-Luciferase-Genkonstrukte konnte bei allen drei PCK1-Promotorfragmenten somit konzentrationsabhängig durch Glucagon stimuliert werden. Die beim endogenen PCK1-Gen beobachtete Hemmung der durch 0,1 nM Glucagon stimulierten Expression durch 100 ng/ml IL6 konnte nicht beobachtet werden. Das könnte darauf hinweisen, daß der Angriffspunkt der IL6-Hemmwirkung außerhalb des bisher eingesetzten Promotorbereiches bis -2500 bp liegt.

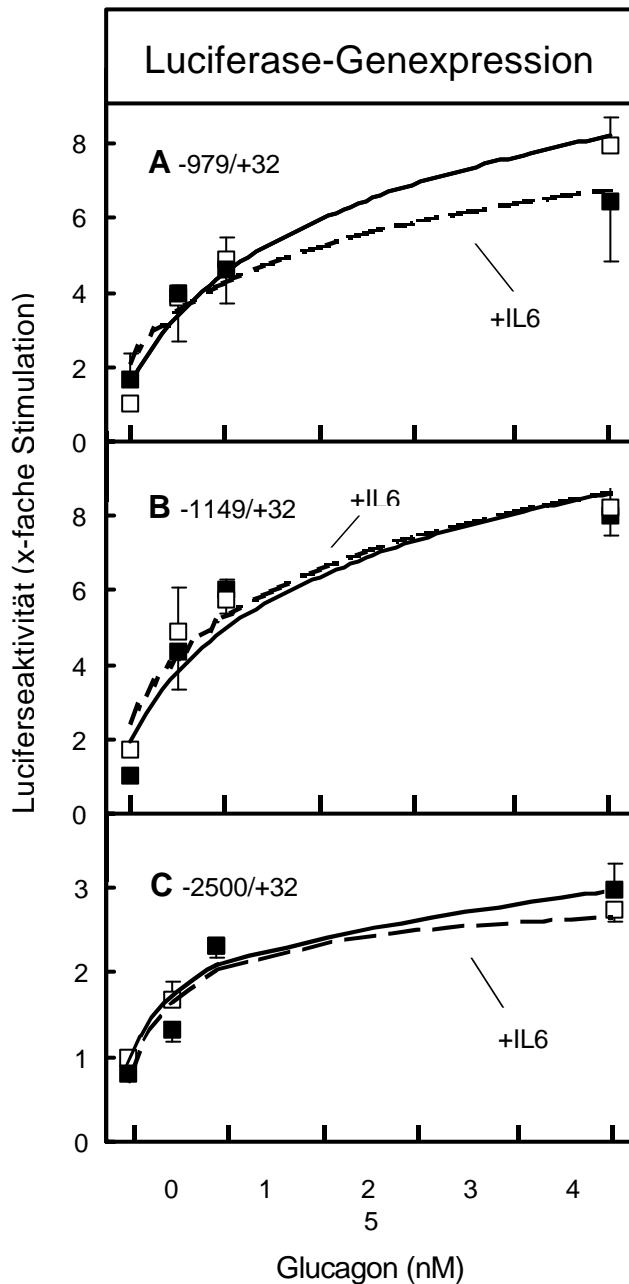


Abb. 20: Stimulation der Luciferase-Genexpression unter der Kontrolle der Promotoren PCKprom-979/+32, PCKprom-1149/+32 und PCKprom-2500/+32 durch Glucagon. Frisch isolierte Rattenhepatozyten wurden mit den Luciferase-Reportergenen PCKprom-979/+32 (A), PCKprom-1149/+32 (B) und PCKprom-2500/+32 (C) transfiziert. Nach 5 h wurde das Medium erneuert und die Hepatozyten für weitere 43 h kultiviert. Die Luciferase wurde über 8 h in Gegenwart unterschiedlicher Glucagon-Konzentrationen mit und ohne 100 ng/ml IL6 induziert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Luciferaseaktivität im Luminometer gemessen. In jedem Experiment wurde die Luciferaseaktivität der unstimulierten Hepatozyten gleich 1 gesetzt. Die durch Glucagon stimulierte Expression der Luciferase wurde als x-fache Stimulation über basal berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten.

4.2.2 Stimulation der Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle der Promotoren PCKprom-979/+32, PCKprom-1149/+32 und PCKprom-2500/+32 durch CPT-cAMP; Einfluß von IL6

Die glucagon-stimulierte Expression der Luciferase-Reportergene PCKprom-979/+32, PCKprom-1149/+32 und PCKprom-2500/+32 wurde durch IL6 nicht beeinflusst. Im Vergleich sollte die Luciferaseexpression mit dem nicht hydrolisierbaren cAMP-Analogen CPT-cAMP stimuliert und der Einfluß von IL6 untersucht werden. In einer früheren Untersuchung wurde die Inhibition der durch 100 nM CPT-cAMP nur schwach auf das 1,6fache induzierte Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle des PCK1-Genpromotors von -979 bis +32 bp durch 100 ng/ml IL6 gezeigt (Christ et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit sollte eine Dosis-Wirkungskurve für die Stimulation der Luciferaseexpression unter der Kontrolle der PCK1-Promotorfragmente PCKprom-979/+32, PCKprom-1149/+32 und PCKprom-2500/+32 durch CPT-cAMP mit und ohne IL6 erstellt werden.

Frisch isolierte Rattenhepatozyten wurden entweder mit dem Luciferase-Reportergenkonstrukt PCKprom-979/+32, mit PCKprom-1149/+32 oder mit PCKprom-2500/+32 transfiziert. Nach fünf Stunden wurde das Medium erneuert und die Zellen über einen Zeitraum von 43 Stunden kultiviert. Die Expression des Luciferasegens wurde dann über acht Stunden mit den in der Legende angegebenen CPT-cAMP-Konzentrationen mit und ohne 100 ng/ml IL6 stimuliert.

Die Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle des PCK1-Promotors von -979 bis +32 bp wurde durch 10 μ M CPT-cAMP 5,6fach über den basalen Wert stimuliert. Bei gleichzeitiger Gabe von 100 ng/ml IL6 wurde die Luciferaseexpression durch 10 μ M CPT-cAMP 9fach über den Basalwert stimuliert. In Gegenwart von IL6 stimulierte 10 μ M CPT-cAMP also die Luciferaseexpression unter der Kontrolle des PCK1-Promotorfragmentes von -979 bis +32 etwa doppelt so stark wie in Abwesenheit von IL6 (Abb. 21A).

Die Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle des PCK1-Promotors von -1149 bis +32 bp wurde bei 10 μ M CPT-cAMP 3,6fach über den basalen Wert stimuliert. Bei gleichzeitiger Gabe von 100 ng/ml IL6 wurde die Expression des Luciferasegens durch 10 μ M CPT-cAMP 3,9fach über den Basalwert stimuliert. IL6 beeinflusste die Stimulation der Luciferaseexpression unter der Kontrolle des PCK1-Promotors von -1149 bis +32 bp durch 10 μ M CPT-cAMP nicht (Abb. 21B).

Unter der Kontrolle des PCK1-Promotors von -2500 bis +32 bp wurde die Expression des Luciferase-Reportergens durch 10 μ M CPT-cAMP 6,7fach über den basalen Wert stimuliert. Bei gleichzeitiger Gabe von 100 ng/ml IL6 wurde die Luciferaseexpression durch 10 μ M CPT-cAMP 5,8fach über den Basalwert stimuliert. In Gegenwart von IL6 war die Stimulation der Luciferasegenexpression unter der Kontrolle des PCK1-Promotors von -2500 bis +32 bp durch 10 μ M CPT-cAMP nicht beeinflusst (Abb. 21C).

Die Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle aller drei PCK1-Promotorfragmente konnte konzentrationsabhängig durch CPT-cAMP stimuliert werden. Während IL6 keinen Einfluß auf die CPT-cAMP-induzierte Expression der Luciferase unter der Kontrolle des PCK1-Promotors von -1149/+32 und von -2500/+32 hatte, wurde die Expression durch den Promotor von -979/+32 verdoppelt. Die IL6-vermittelte Hemmung, der durch 100 nM CPT-cAMP nur schwach 1,6fach stimulierten Luciferase-expression durch den PCK1-Promotor von -979 bis +32 bp (Christ et al., 1997), konnte in der vorliegenden, breiter angelegten Untersuchung nicht bestätigt werden. Vielmehr ergab sich, daß im PCK1-Promotor ein IL6-abhängiges stimulierendes Element (Enhancer) im

Bereich bis -979 bp und ein abschwächendes Element im Bereich zwischen -980 und -1149 bp vorhanden sein müssen.

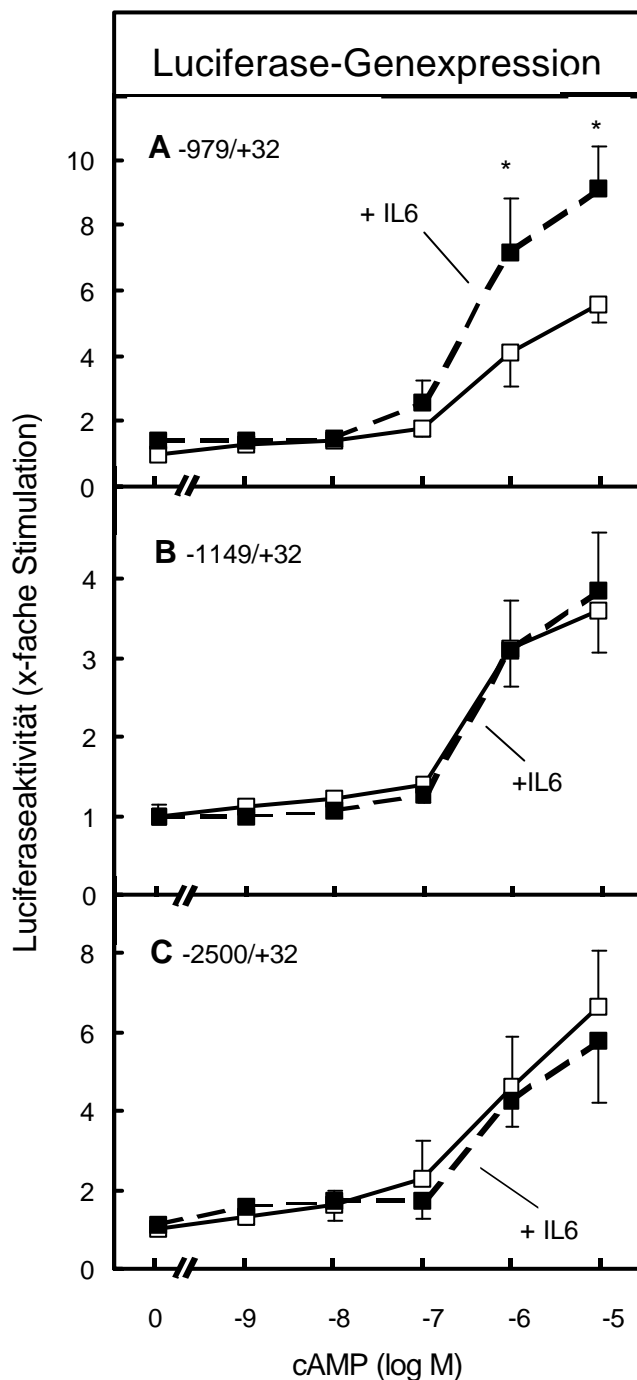


Abb. 21: Stimulation der Luciferase-Genexpression unter der Kontrolle der Promotoren PCKprom-979/+32, PCKprom-1149/+32 und PCKprom-2500/+32 durch CPT-cAMP. Frisch isolierte Rattenhepatozyten wurden mit den Luciferase-Reportergen PCKprom-979/+32 (A), PCKprom-1149/+32 (B) und PCKprom-2500/+32 (C) transfiziert. Nach 5 h wurde das Medium erneuert und die Hepatozyten für weitere 43 h kultiviert. Die Luciferaseexpression wurde über 8 h in Gegenwart unterschiedlicher CPT-cAMP-Konzentrationen mit oder ohne 100 ng/ml IL6 induziert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Luciferaseaktivität im Luminometer gemessen. In jedem Experiment wurde die Luciferaseaktivität der unstimulierten Hepatozyten gleich 1 gesetzt. Die durch CPT-cAMP stimulierte Luciferaseexpression ist dazu relativ. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte. *: $p \leq 0,05$ versus ohne IL6.

Da die Hemmung der glucagon-stimulierten endogenen PCK1-Genexpression durch IL6 offensichtlich über einen Bereich stromaufwärts von -2500 bp vermittelt wird, wurde zunächst versucht, um langwierige Klonierungsversuche zu vermeiden, ein entsprechendes Konstrukt mit bis zu -4800 bp von Herrn T. Ip und Herrn R. Chalkley zu erhalten. Trotz wiederholter Anfragen gab es keine Resonanz, so daß dieser Ansatz nicht weiter verfolgt werden konnte.

4.2.3 Stimulation der Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle der Promotoren PCKprom-1038/+32 und PCKprom-1068/+32 durch CPT-cAMP; Einfluß von IL6

Während die cAMP-stimulierte Expression der Luciferase unter der Kontrolle des PCK1-Promotors von -979 bis +32 bp durch IL6 weiter gesteigert wurde, war diese Stimulation unter der Kontrolle des PCK1-Promotors von -1149 bis +32 bp nicht zu beobachten. Dementsprechend mußte der Sequenzabschnitt von -979 bis -1149 bp eine Region enthalten, die die Stimulation durch IL6 aufhob. Deshalb sollte dieser Bereich in Transfektionsstudien weiter charakterisiert werden.

Die Sequenz des PCK1-Promotors bis -1149 bp wurde arbiträr unterteilt. Durch PCR wurden zwei verkürzte PCK1-Promotorfragmente von -1068 bis +32 bp und von -1038 bis +32 bp konstruiert. Die beiden Fragmente wurden im pGL3basic-Vektor vor das Luciferase-Reportergen kloniert, so daß die Plasmide PCKprom-1068/+32 und PCKprom-1038/+32 entstanden.

Frisch isolierte Rattenhepatozyten wurden mit dem jeweiligen Luciferase-Reportergenkonstrukt transfiziert. Nach 5h wurde das Medium erneuert und die Zellen über einen Zeitraum von 43 h kultiviert. Die Luciferaseexpression wurde für acht Stunden mit steigenden CPT-cAMP-Konzentrationen in Gegenwart oder Abwesenheit von 100 ng/ml IL6 induziert.

Die Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle des PCK1-Promotors von -1038 bis +32 bp wurde mit 10 µM CPT-cAMP 12fach über den basalen Wert stimuliert. Bei gleichzeitiger Gabe von 100 ng/ml IL6 wurde die Luciferase-Genexpression durch 10 µM CPT-cAMP 16fach über den Basalwert stimuliert (Abb. 22A). IL6 steigerte also die durch 10 µM CPT-cAMP induzierte Luciferaseexpression ca. 1,3fach. Bei Stimulation mit 1 µM CPT-cAMP lag die IL6-erhöhte Expression der Luciferase 2,1fach über der Expression in Abwesenheit von IL6.

Die Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle des PCK1-Promotors von -1068 bis +32 bp wurde mit 10 µM CPT-cAMP 4,3fach über die basale Expression stimuliert. In Gegenwart von 100 ng/ml IL6 wurde die Luciferaseexpression durch 10 µM CPT-cAMP 4,7fach über den Basalwert induziert (Abb. 22B). Bei Stimulation mit 1 µM CPT-cAMP lag die IL6-erhöhte Expression der Luciferase 1,3fach über der Expression in Abwesenheit von IL6. IL6 hatte keinen Einfluß auf die durch 10 µM CPT-cAMP stimulierte Expression des Transgens unter der Kontrolle des PCK1-Promotors von -1068 bis +32 bp.

Bei 1 µM CPT-cAMP stimulierte IL6 die Luciferaseexpression unter der Kontrolle des PCK1-Genpromotors von -1068 bis +32 bp nur noch 1,3fach gegenüber 2,1fach unter der Kontrolle des PCK1-Genpromotors von -1038 bis +32 bp. Daher wurde angenommen, daß

im Bereich des PCK1-Promotors von -1038 bis -1068 bp eine Region liegt, die die Stimulation des PCK1-Promotors durch IL6 teilweise aufhebt.

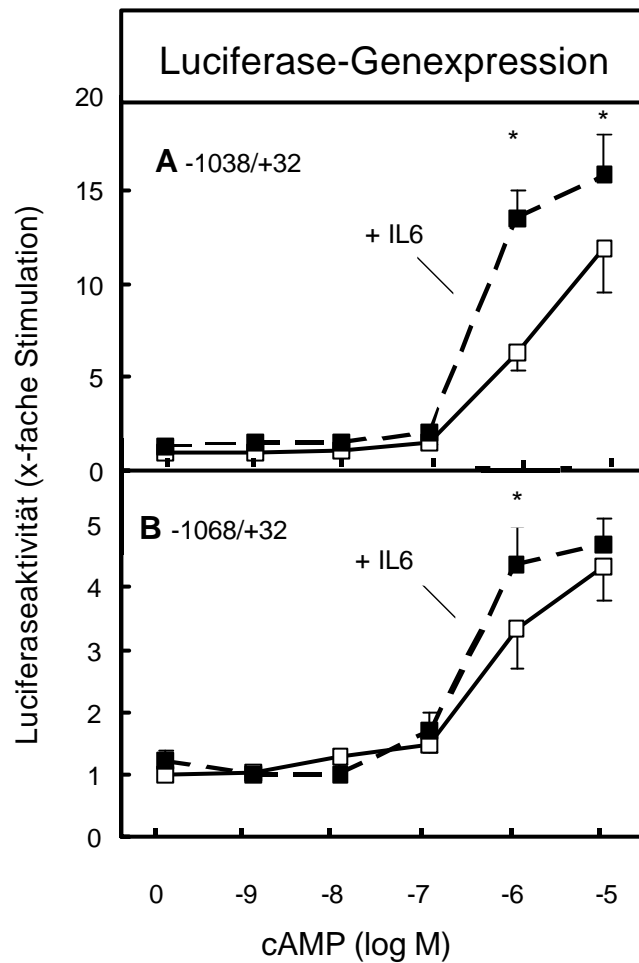


Abb. 22: Stimulation der Luciferase-Genexpression unter der Kontrolle der Promotoren PCKprom-1038/+32 und PCKprom-1068/+32 durch CPT-cAMP. Frisch isolierte Rattenhepatozyten wurden mit den Luciferase-Reportergenen PCKprom-1038/+32 (A) und PCKprom-1068/+32 (B) transfiziert. Nach 5 h wurde das Medium erneuert und die Hepatozyten für weitere 43 h kultiviert. Die Luciferaseexpression wurde mit steigenden CPT-cAMP-Konzentrationen in An- und Abwesenheit von 100 ng/ml IL6 stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Luciferaseaktivität im Luminometer gemessen. In jedem Experiment wurde die Luciferaseaktivität der unstimulierten Hepatozyten gleich 1 gesetzt. Die durch CPT-cAMP stimulierte Luciferaseexpression ist dazu relativ. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte; *: $p \leq 0,05$ versus ohne IL6.

4.2.4 Stimulation der Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle des mutierten PCK1-Genpromotors PCKprom-1149/+32mut durch CPT-cAMP; Einfluß von IL6

Während die durch 1 µM CPT-cAMP stimulierte Expression des Luciferasegens vom PCK1-Promotor PCKprom-1038/+32 durch IL6 2,1fach stimuliert wurde, wurde die vom Promotor PCKprom-1068/+32 nur noch 1,3fach stimuliert. Bei 10 µM CPT-cAMP wurde die Luciferase-Genexpression vom PCK1-Promotor PCKprom-1038/+33 1,3fach und vom Promotor PCKprom-1068/+33 nur noch unwesentlich durch IL6 gesteigert (Abb. 22). Das ließ darauf schließen, daß sich im Bereich zwischen -1068 und -1038 bp eine die IL6-stimulierte PCK1-Genexpression hemmende Region befand. Es wurde eine Computeranalyse durchgeführt, um Bereiche zu identifizieren, die potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren sein könnten. In den durch IL6 stimulierten Promotoren der Akut-Phase-Proteine wurden zwei Typen von IL6-responsiven Elementen (IL6-RE) beschrieben. Typ 1 ist durch die Consensus-Sequenz T(T/G)NNGNAA(T/G) und Typ 2 durch das Hexanukleotidmotiv CTGGGA charakterisiert (Kasutani et al., 1998). Die genuine PCK1-Sequenz TCGTTCAAT im Bereich von -1051 bis -1043 bp kann dem Typ 1 der IL6-RE zugeordnet werden. Dieser Sequenzbereich ist mit einer von Tsukada et al. (1994) beschriebenen Bindungsstelle für den IL6-aktivierten Transkriptionsfaktor C/EBPβ zu 78 % identisch. Um zu prüfen, ob diese Region am Verlust der Stimulation der CPT-cAMP-aktivierten PCK1-Genexpression durch IL6 beteiligt war, wurde durch ein PCR-Verfahren ein Reportergenkonstrukt hergestellt, in dem die Luciferaseexpression unter der Kontrolle des PCK1-Genpromotors von -1149 bis +32 bp stand. In diesem Promotorfragment waren die Basen CA an Position -1046 und -1045 in der potentiellen C/EBPβ-Bindungsstelle ausgetauscht gegen die Basen GT. Die mutierte C/EBPβ-Bindungsstelle wies nur noch eine Homologie von 44 % zur Konsensussequenz der Typ 1 IL6-RE auf. Es wurde hier das 1149 bp lange Promotorfragment anstelle des 1068 bp langen Fragments verwendet, um mögliche kooperative Effekte im Promotor zu erhalten. Das Konstrukt wurde in kultivierte Rattenhepatozyten transfiziert und die Expression der Luciferase mit unterschiedlichen Konzentrationen an CPT-cAMP in Gegenwart oder Abwesenheit von 100 ng/ml IL6 induziert.

Die Expression des Luciferasegens wurde durch 10 µM CPT-cAMP 7,5fach über die basale Expression gesteigert. In Gegenwart von IL6 stimulierte 10 µM CPT-cAMP die Luciferaseexpression 10fach über basale nicht-stimulierte Werte (Abb. 23). IL6 steigerte also die durch 10 µM CPT-cAMP stimulierte Luciferaseexpression 1,3fach. Die durch 1 µM CPT-cAMP stimulierte Luciferase-Genexpression wurde durch IL6 1,2fach gesteigert.

Der Vergleich der IL6-vermittelten Stimulation der durch 1 µM oder 10 µM CPT-cAMP-induzierten Luciferase-Expression unter der Kontrolle der PCK1-Genpromotorfragmente PCKprom-1149/+32 und PCKprom-1149/+32IL6REmut ergab folgende Situation (Abb. 14): IL6 steigerte die durch 1 µM stimulierte Luciferasegenexpression der beiden

Promotorfragmente nicht bzw. 1,2fach. Bei 10 μ M CPT-cAMP wurde die Luciferasegenexpression 1,1fach bzw. 1,3fach in Gegenwart von IL6 stimuliert. D.h., während die Expression der Luciferase ausgehend vom Wildtyp PCK1-Genpromotor bis -1149 bp durch IL6 nicht stimuliert wurde, wurde die Stimulierbarkeit durch partielle Mutation der C/EBP β -Bindungsstelle zwischen -1051 und -1042 bp teilweise wieder hergestellt (Abb. 24). Offensichtlich ist diese Bindungsstelle also für die Aufhebung der Stimulierbarkeit des PCK1-Genpromotors durch IL6 verantwortlich.

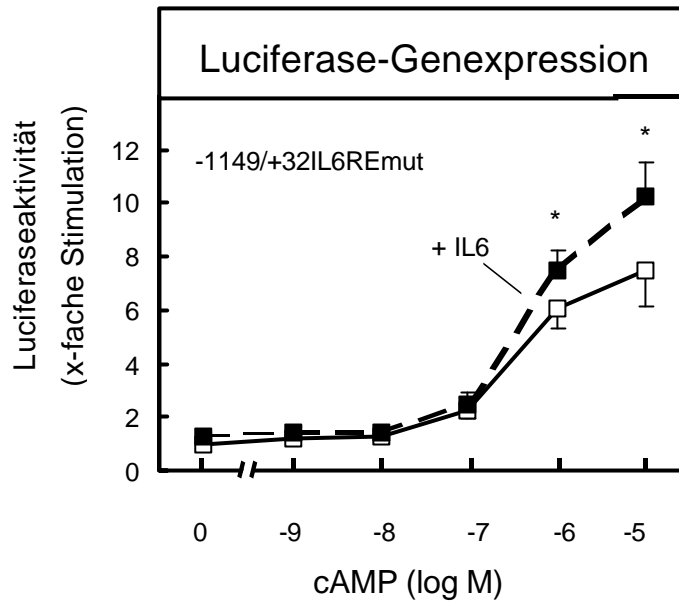


Abb. 23: Stimulation der Luciferase-Genexpression unter der Kontrolle des PCK1-Promotors PCKprom-1149/+32IL6REmut. Frisch isolierte Rattenhepatozyten wurden mit dem Luciferase-Reportergen PCKprom-1149/+32IL6REmut, in dem die potentielle C/EBP β -Bindungsstelle zwischen -1051 und -1042 bp mutiert wurde, transfiziert. Nach 5 h wurde das Medium erneuert und die Hepatozyten für weitere 43 h kultiviert. Die Luciferaseaktivität wurde über 8 h mit steigenden Konzentrationen an CPT-cAMP mit und ohne 100 ng/ml IL6 induziert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Luciferaseaktivität im Luminometer gemessen. In jedem Experiment wurde die Luciferaseaktivität der unstimulierten Hepatozyten gleich 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm von 3 unabhängigen Experimenten. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte; *: $p \leq 0,05$ versus ohne IL6.

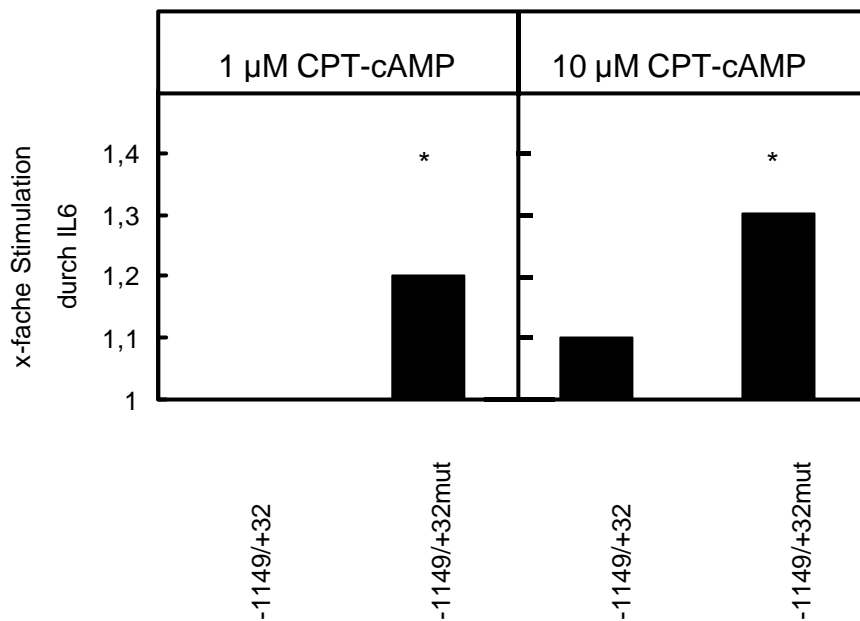


Abb. 24: Vergleich der Stimulation der Luciferase-Genexpression der PCK1-Promotorkonstrukte PCKprom-1149/+32 und PCKprom-1149/+32IL6REmut durch CPT-cAMP und IL6. Frisch isolierte Rattenhepatozyten wurden mit den Luciferase-Reportergenen PCKprom-1149/+32 oder PCKprom-1149/+32IL6REmut, in dem die potentielle C/EBP β -Bindungsstelle zwischen -1051 und -1042 bp mutiert wurde, transfiziert. Nach 5 h wurde das Medium erneuert und die Hepatozyten für weitere 43 h kultiviert. Die Luciferaseaktivität wurde über 8 h mit 1 μ M bzw. 10 μ M CPT-cAMP mit und 100 ng/ml IL6 induziert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Luciferaseaktivität im Luminometer gemessen. In jedem Experiment wurde die Luciferaseaktivität der unstimulierten Hepatozyten gleich 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Statizik: Student's t-Test für gepaarte Werte; *: $p \leq 0,05$ versus PCKprom-1149/+32. Die x-fache Stimulation durch IL6 wurde aus den Werten der Abbildungen 21 und 23 bestimmt.

4.2.5 Vergleich der Stimulierbarkeit aller untersuchten PCK1-Promotoren durch CPT-cAMP und IL6

Alle untersuchten PCK1-Promotorkonstrukte ließen sich konzentrationsabhängig mit CPT-cAMP stimulieren (Abb. 21ABC, 22 AB, 23). Die Expression des Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle des PCK1-Promotorkonstruktes von -979 bis +32 bp wurde mit einer CPT-cAMP-Konzentration von 1 μ M 4fach, und das PCK1-Promotorkonstrukt von -1038 bis +32 bp 6,5fach über dem basalen Wert stimuliert. Die PCK1-Promotorkonstrukte von -1068 bis +32 bp und von -1149 bis +32 bp ließen sich mit 1 μ M CPT-cAMP ungefähr 3fach über den Basalwert stimulieren. Der mutierte PCK1-Promotor -1149/+32IL6REmut war doppelt so sensitiv gegenüber 1 μ M CPT-cAMP wie der „Wildtyppromotor“ PCKprom-1149/+32. Die Expression ließ sich 6fach über den basalen Wert steigern. Der PCK1-Promotor bis -2500 bp wurde 4fach über den Basalwert stimuliert (Abb. 25).

CPT-cAMP reguliert offensichtlich die Luciferase-Genexpression unter der Kontrolle der verschiedenen PCK1-Promotoren über unterschiedliche Regionen im PCK1-Promotor.

IL6 verstärkte die Expression der CPT-cAMP-induzierten Luciferaseaktivität der PCK1-Promotorkonstrukte von -979 bis +32 bp und von -1038 bis +32 bp um nahezu 100 %. Während die Expression des PCK1-Promotors bis -1068 bp noch geringfügig durch IL6 gesteigert wurde, war kein IL6-Effekt auf die CPT-cAMP-induzierte Luciferaseaktivität des PCK1-Promotorkonstruktes bis -1149 bp zu beobachten. Die CPT-cAMP-induzierte Expression des mutierten PCK1-Promotors -1149/+32IL6REmut wurde durch IL6 1,2fach gesteigert. Jedoch wurde der mutierte Promotor im Vergleich zum „Wildtyp“ PCK1prom -1149/+32 doppelt so stark durch 1 μ M CPT-cAMP mit und ohne IL6 stimuliert. Keinen Effekt hatte IL6 auf die CPT-cAMP-induzierte Luciferaseaktivität ausgehend vom PCK1-Promotor von -2500 bis +32 bp (Abb. 25).

Im Bereich von -1038 bis zu -1068 bp wurde im PCK1-Genpromotor eine potentielle Bindungsstelle für C/EBP β lokalisiert. Eine exakte Identifizierung der involvierten Basen wurde im mutierten PCK1-Promotor -1149/+32IL6REmut nicht vorgenommen. Die gezeigte Zusammenstellung (Abb. 25) unterstützt jedoch die Vermutung, daß die potentielle C/EBP β -Bindungsstelle die Qualität eines Silencers hat, da die Mutation dieser Stelle die Stimulierbarkeit durch cAMP und die zusätzliche Stimulation durch IL6 wiederherstellte. Da mit keinem der verwendeten Konstrukte die beim endogenen PCK1-Gen beobachtete Hemmung durch IL6 gezeigt werden konnte, wird die Hemmung des PCK1-Genpromotors durch IL6 über Bereiche vermittelt, die stromaufwärts von -2500 bp liegen.

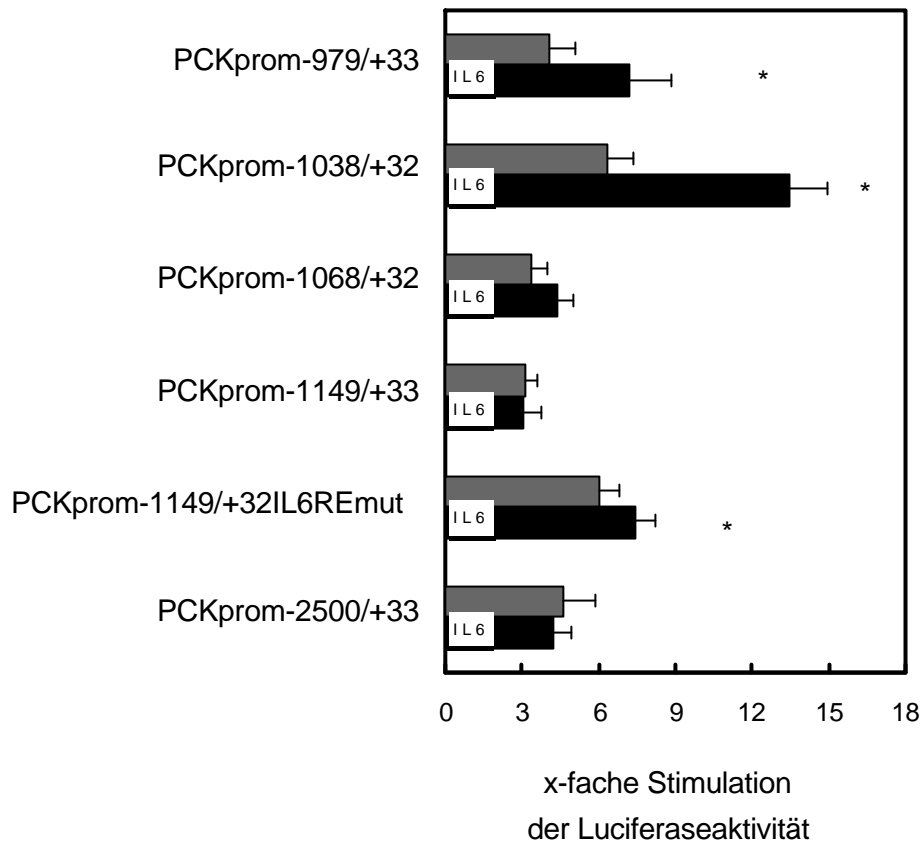


Abb. 25: Vergleich der Stimulation der Luciferase-Genexpression aller verwendeten PCK1-Promotoren durch CPT-cAMP und IL6 in primär kultivierten Ratten-hepatozyten. Frisch isolierte Rattenhepatozyten wurden mit Luciferase-Reporter genen unter der Kontrolle verschiedener trunkierter bzw. mutierter PCK1-Promotoren transfiziert. Nach 5 h wurde das Medium erneuert und die Hepatozyten für weitere 43 h kultiviert. Die Luciferaseaktivität wurde über 8 h mit 1 μ M CPT-cAMP mit und ohne 100 ng/ml IL6 induziert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Luciferaseaktivität im Luminometer gemessen. In jedem Experiment wurde die Luciferaseaktivität der unstimulierten Hepatozyten gleich 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm von 3 unabhängigen Experimenten. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte; *: $p \leq 0,05$ versus ohne IL6. Die Werte sind den Abbildungen 21, 22 und 23 entnommen.

5. DISKUSSION

Der Glucose-Stoffwechsel unterliegt im gesunden Organismus einer strikten Regulation. Nur so kann gewährleistet sein, daß die obligat Glucose nutzenden Organe wie das Nervengewebe, das Nierenmark und die Erythrozyten funktionsfähig bleiben. Bei Diabetikern kann die Blutglucose-Konzentration den sog. Nierenschwellenwert (10 mM) überschreiten, was zur Ausscheidung von Glucose im Harn führte. Bei der gleichen Erkrankung bewirken langfristig erhöhte Blut-Glucosekonzentrationen Organschädigungen z.B. Netzhautveränderungen, eingeschränkte Nierenfunktion oder Gefäßveränderungen (Horowitz, 1993; Vinik et al., 1992).

Im Verlauf einer prolongierten Akut-Phase-Reaktion, z.B. einer Sepsis, stellt die auftretende Hypoglykämie (Mizock et al., 1995) eine Komplikation in der Pathogenese des septischen Schocks dar. Ursache der Hypoglykämie ist bei erhöhtem Bedarf die verminderte Glucosebereitstellung durch die Leber, deren molekulare Mechanismen bisher unbekannt sind. Es war die Frage, ob und auf welcher Ebene der Glucagon-wirkungskette, die in der Leber die Glucoseproduktion steigert, die Angriffspunkte des IL6, dem Hauptmediator der Akut-Phase-Reaktion, liegen.

Glucagon stimuliert über cAMP kurzfristig die Glykogenolyse und mittelfristig über die Erhöhung der Expression des Schlüsselenzyms PCK1 die Gluconeogenese. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob der Glucagon-Rezeptor und der PCK1-Genpromotor mögliche Ziele der glucagon-antagonistischen IL6-Wirkung sind. IL6 hemmte sowohl den glucagon- als auch den – zum Vergleich gemessenen, ebenfalls cAMP vermittelten – isoproterenol-stimulierten Anstieg der PCK1-mRNA Expression. IL6 hemmte nur die glucagon-stimulierte cAMP-Bildung und infolge dessen auch die Glucosefreisetzung aus Glykogen. IL6 hatte keinen Einfluß auf die isoproterenol-stimulierte cAMP-Bildung und Glucosefreisetzung. IL6 erhöhte die Affinität des Glucagons zum Rezeptor.

Weiterhin verstärkte IL6 die cAMP-induzierte Expression des Luciferasegens unter der Kontrolle der PCK1-Promotorfragmente bis -979 bp und bis -1038 bp. IL6 hatte keinen Effekt auf die cAMP-induzierte Expression des Luciferasegens unter der Kontrolle der PCK1-Promotorfragmente bis -1068 bp, -1149 bp und -2500 bp. Die Hemmung der endogenen glucagon-stimulierten PCK1-Genexpression durch IL6 muß daher durch eine Region stromaufwärts von 2500 bp erfolgen. Es konnte gezeigt werden, daß IL6 über die durch Computeranalysen lokalisierte potentielle C/EBP-Bindungsstelle zwischen -1051 und -1042 bp die Funktion eines Silencers ausübt, die im Bereich bis -1038 bp lokalisiert ist und so die Verstärkung der cAMP-induzierten PCK1-Genexpression durch IL6 aufhebt.

5.1 Hemmung der Glucagon-Wirkung durch IL6 auf der Ebene des Glucagon-Rezeptors

Der Glucagon-Rezeptor und auch der β -adrenerge Rezeptor gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCR). Der Ligand-Rezeptor-Komplex aktiviert über die Kopplung an ein stimulatorisches G-Protein, G_s , die Adenylatzyklase und stimuliert so die Bildung von intrazellulärem cAMP. Dieser „second messenger“ aktiviert die Protein-Kinase A (PK A), die durch Modifikation weiterer unterschiedlicher Enzyme den Stoffwechsel verschiedener Gewebe charakteristisch umstellt. In der Leber wird verstärkt Glykogen zu Glucose abgebaut bei gleichzeitiger Hemmung der Glykogenbiosynthese. Zusätzlich wird die Gluconeogenese stimuliert, indem die PK A-vermittelte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB die Transkription der PCK1 aktiviert (Hanson et al., 1997; Montminy, 1997).

5.1.1 Hemmung der glucagon-stimulierten, nicht aber der isoproterenol-stimulierten cAMP-vermittelten Glucose-Freisetzung durch IL6 auf einer Ebene vor der cAMP-Bildung

Glucagon und der β -Agonist Isoproterenol aktivieren die Adenylatzyklase, so daß transient die intrazellulären cAMP-Konzentrationen ansteigen und die Glykogenolyse stimuliert wird (De Blasi, 1990; Burcelin et al., 1996). Bisher gibt es relativ wenig Hinweise auf eine mögliche Hemmung der cAMP-Bildung durch IL6. Konditioniertes Medium von aktivierten Milzzellen, das IL6 enthalten sollte, verminderte den isoproterenol-stimulierten cAMP-Anstieg in Ratten-Herzmuskelzellen über einen G-Protein gekoppelten Mechanismus (Chung et al., 1990). Dies steht im Widerspruch zu den eigenen Arbeiten, wonach in kultivierten Rattenhepatozyten IL6 den isoproterenol-stimulierten cAMP-Anstieg nicht hemmte. In Zellen aus der vorderen Hypophyse hemmte IL6 den forskolin-stimulierten cAMP-Anstieg (Grimaldi et al., 1992), während in kultivierten Rattenhepatozyten kein IL6-Effekt auf den forskolin-stimulierten cAMP-Anstieg nachweisbar war (Christ et al., 1997). In humanen Schilddrüsenzellen verringerte IL6 geringfügig die cAMP-Bildung (Krogh-Rasmussen et al., 1990). $TNF\alpha$ oder IL6 reduzierten *in vivo* die Blut-Glucosekonzentrationen und verursachten in Ratten und Mäusen Hypoglykämien (Battelino et al., 1999; Strassmann et al., 1993).

In kultivierten Rattenhepatozyten wurde die Gluconeogenese durch einen Mix aus $IL1\beta$, $TNF\alpha$, Interferon γ und Endotoxin gehemmt (Titheradge et al., 1995; Ceppi und Titheradge, 1998). Die Glucosebildung wurde in primär kultivierten Rattenhepatozyten durch $TNF\alpha$ reduziert (Dahn et al., 1994). Andererseits wurde gezeigt, daß die Gluconeogenese nicht beeinflusst wurde, wenn Rattenhepatozyten über einen Zeitraum von 24 Stunden mit $TNF\alpha$ oder $IL1\alpha$ kultiviert wurden. IL6 stimulierte über diesen Zeitraum die Gluconeogenese (Blumberg et al., 1995). Die kurzfristige Behandlung mit $IL1\beta$ oder $TNF\alpha$ führte dagegen zur Hemmung der Gluconeogenese (Christ und Nath, 1996). In der vorliegenden Arbeit

hemmte IL6 die glucagon-, nicht aber die isoproterenol-stimulierte Glucosebildung aus Glykogen in kultivierten Rattenhepatozyten und in der perfundierten Rattenleber (Abb. 14, 16).

Die Glucagonwirkung wird u.a. durch den Antagonisten Insulin aufgehoben. Insulin aktiviert die Phosphodiesterase und stimuliert so den cAMP-Abbau (Pilkis und Granner, 1992). Prostaglandin E₂ bindet an den Gi-gekoppelten EP3-Rezeptor und hemmte sowohl die glucagon-stimulierte Glykogenolyse als auch die Induktion der PCK1 und damit die Gluconeogenese (Püschel et al., 1993; Püschel und Christ, 1994). Es wurde gezeigt, daß IL6 in kultivierten Rattenhepatozyten den glucagon-stimulierten cAMP-Anstieg weder durch die Aktivierung der Phosphodiesterase noch durch Kopplung an das Gi hemmte (Christ et al., 1997)

Da IL6 nur die glucagon-, nicht aber die isoproterenol-stimulierte cAMP-vermittelte Glucosefreisetzung hemmte, kann der Rückschluß gezogen werden, daß IL6 den glucagon-stimulierten cAMP-Anstieg entweder auf der Stufe des Glucagonrezeptors oder aber auf der Stufe der Kopplung an das stimulatorische G-Protein hemmte.

5.1.2 Hemmung der glucagon-stimulierten cAMP-Bildung durch IL6 auf der Ebene der Kopplung des Glucagon-Rezeptors am G_s

J¹²⁵-Glucagon band an Membranen aus primär kultivierten Rattenhepatozyten mit einer K_D von 3 nM. Die Affinität dieser Bindungsstelle ist vergleichbar mit den K_D-Werten von 0,5 nM und 1,2 nM an Membranen aus Rattenleber (Unson et al., 1996). Weiterhin ist diese K_D auch vergleichbar mit den K_D-Werten an Membranen aus mit dem Glucagon-Rezeptor transfizierten COS-1-Zellen. Hier wurde die K_D mit 5 nM (Heurich et al., 1996), mit 10,4 nM (Unson et al., 1995), mit 19,7 nM (Carruthers et al., 1994) und mit 40 nM (Cypess et al., 1999) bestimmt.

IL6 verringerte in primär kultivierten Rattenhepatozyten die K_D auf 0,5 nM und erhöhte somit die Affinität des Glucagon-Rezeptors zum Liganden 6fach. Die Steigerung der Affinität zwischen Rezeptor und Ligand erlaubt über die Bindung an ein stimulatorisches G-Protein die Aktivierung der Adenylatzyklase schon bei geringen Ligandenkonzentrationen (Krauss, 1997). Solange die Kopplung des Agonist-Rezeptor-Komplexes an das G-Protein besteht, ist die Liganden-Bindungsstelle hochaffin. Dissoziiert das G-Protein vom aktivierten Rezeptor, reduziert sich die Affinität zwischen Rezeptor und Ligand und der Rezeptor kann den Ligand leichter verlassen; die intrazelluläre Signaltransduktion wird durch das dissoziierte G-Protein fortgesetzt (Strader et al., 1994).

Wenn in Gegenwart von IL6 die Affinität des Glucagons zum Rezeptor in einer Größenordnung zunähme, die der Zunahme der Affinität des Rezeptors am Gs entspräche, könnte die Steigerung der Affinität des Glucagons zum Rezeptor durch IL6 eine Verstärkung der Kopplung des Agonist-Rezeptor-Komplexes an das G-Protein bedeuten. Da aber gleichzeitig die cAMP-Bildung durch IL6 gehemmt wurde, würde die Zunahme der Kopplung an Gs eine funktionelle Inaktivierung des Glucagon-Rezeptors bedeuten (s. 5.1.3).

5.1.3 Hemmung der Signaltransduktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) bei Erhöhung der Ligandenaffinität

Prototypen der GPCRs mit stark konservierten Sequenzmotiven und funktionellen Domänen sind der Rhodopsin- und der β -adrenerge Rezeptor. Beide gehören zur Klasse I der GPCRs (Strader et al., 1995; Sakmar, 1998), während der Glucagon-Rezeptor, der keine Sequenzhomologie zur Klasse I aufweist, der Klasse II der GPCRs zugeordnet ist. Hierzu zählt u.a. auch der GLP-1-(glucagon-like peptide-1)- und der VIP-(vasoactive intestinal peptide)-Rezeptor (Unson et al., 1996). Alle diese Rezeptoren weisen drei unterschiedliche funktionelle Regionen auf: Region 1 beinhaltet die proximale N-terminale Domäne mit putativen Glykolysierungsstellen; Region 2 besteht aus dem distalen Anteil der N-terminalen Domäne, den sieben Transmembran-Helices und den drei extrazellulären Domänen; Region 3 stellt den intrazellulären Anteil mit den drei cytoplasmatischen und der C-terminalen Domäne dar (Ji et al., 1998; Gether und Kobilka 1998) (Abb. 26).

Während bei vielen Membranproteinen die Glykolysierung für die korrekte Proteinfaltung und den Transport zur Zellmembran notwendig ist (Kusui et al., 1994), gilt dies nicht für den Glucagon-Rezeptor (Unson et al., 1995). Die distale N-terminale Domäne, die erste extrazelluläre Schleife und die dritte, vierte und sechste Transmembrandomäne sind an der Ligandenbindung beteiligt (Buggy et al., 1995). Unson und Mitarbeiter (1996) haben gezeigt, daß sowohl in der N-terminalen Domäne als auch in der ersten extrazellulären Schleife des Glucagon-Rezeptors Bereiche lokalisiert sind, die an der Ligandenbindung beteiligt sind. Beide Domänen sind auch im VIP-Rezeptor für die Ligandenbindung verantwortlich (Holtmann et al., 1995). Die direkte intrazelluläre Signaltransduktion, d.h. die Aktivierung des G-Proteins, wird im Rhodopsin-Rezeptor durch die dritte Region, vor allem von der zweiten und dritten cytoplasmatischen Schleife, vermittelt (Ernst et al., 1995).

Bis heute ist relativ wenig über den genauen molekularen Mechanismus der Kopplung des Glucagon-Rezeptors an das stimulatorische G-Protein bekannt. Jedoch wurde gezeigt, daß die Kopplung an das G-Protein über die zweite und dritte cytoplasmatische Schleife des Glucagon-Rezeptors vermittelt wird (Cypess et al., 1999). Die Deletion von acht Aminosäuren in der zweiten Schleife erhöhte die Affinität zwischen Glucagon und dem Rezeptor und reduzierte die cAMP-Bildung (Chicci et al., 1997). Der GLP-1-Rezeptor

vermittelt die intrazelluläre Signaltransduktion ebenfalls über die dritte cytoplasmatische Schleife (Takhar et al., 1996; Mathi et al., 1997). Die Punktmutation eines Arginin-Restes gegen ein Glycin in dieser Schleife steigerte die Affinität zwischen Ligand und Rezeptor, gleichzeitig konnte die cAMP-Bildung nicht mehr stimuliert werden (Heller et al., 1996). Die Beteiligung beider Schleifen an der Kopplung zwischen Rezeptor und G-Protein ist auch für GPCRs der Klasse I nachgewiesen (Wess, 1997).

Somit unterstützen die Literaturdaten die hier vorgestellte Schlußfolgerung, daß IL6 den Glucagon-Rezeptor durch verstärkte Kopplung an das Gs funktionell inaktiviert (s. 5.1.2).

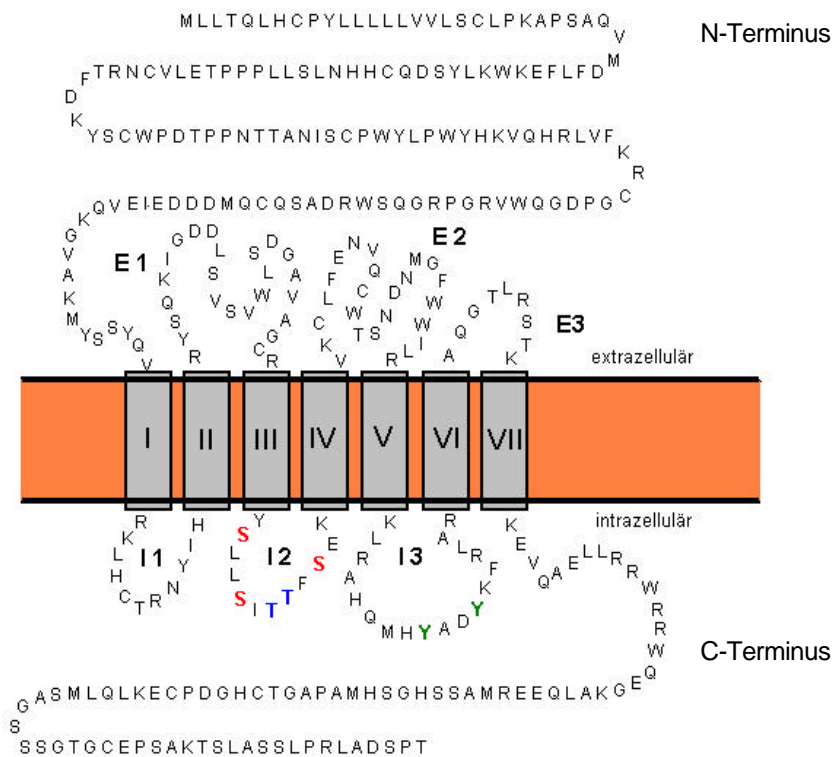


Abb. 26: Schematische Darstellung der Struktur und Funktion des Glucagon-Rezeptors. Der Glucagon-Rezeptor besteht aus sieben Transmembran-Helices (I-VII), drei extrazellulären Schleifen (E1-E3) und drei intrazellulären Schleifen (I1-I3). Die potentiellen Phosphorylierungsstellen sind farbig gekennzeichnet: S: Serin; T: Threonin; Y: Tyrosin.

5.1.4 Modell der IL6-induzierten Desensitivierung des Glucagon-Rezeptors

Die schnelle Desensitivierung eines Signals trotz persistierender Einwirkung extrazellulärer Stimuli erfolgt über die Phosphorylierung des Rezeptors. β -adrenerge Rezeptoren werden über zwei Mechanismen reguliert. Einerseits können durch die cAMP-abhängige PK A oder PK C Serin-Reste am Rezeptor phosphoryliert und dadurch die Aktivierung des stimulatorischen G-Proteins verhindert werden (Ferguson und Caron, 1998). Andererseits wird der aktivierte Rezeptor zum Substrat für β -adrenerge Rezeptor-assoziierte Kinasen (BARK). Diese Kinasen phosphorylieren Serin- und Threonin-Reste in der carboxyterminalen Domäne des Rezeptors. Der phosphorylierte Rezeptor bindet Arrestin und es folgt die Entkoppelung zwischen Rezeptor und G-Protein (Pitcher et al., 1998; Bünemann und Hosey, 1999). GPCRs können auch Substrate für Tyrosin-Kinasen sein (Malbon und Karoor, 1998).

Die Desensitivierung vieler GPCRs erfolgt also über die Phosphorylierung cytoplasmatischer Serin- und Threonin-Reste durch die Protein-Kinasen PK A, PK C und/oder G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinasen (Inglese et al., 1993). Auch Tyrosin-Kinasen können an der Desensitivierung beteiligt sein (Malbon und Karoor, 1998). IL6 aktiviert einerseits Tyrosin-Kinasen, andererseits jedoch auch Serin-/Threonin-Kinasen, die über den MAPK-Signalweg stimuliert werden (Heinrich et al., 1998).

Die Phosphorylierung des VIP-Rezeptors, der genau wie der GLP-1-Rezeptor und der Glucagon-Rezeptor zur Klasse II der GPCRs gehört, wird über die PK A und eine weitere unbekannte Kinase vermittelt (McDonald et al., 1998). Die heterologe Desensitivierung (Agonisten-unabhängige Auslösung) des GLP-1-Rezeptor führte zur Phosphorylierung von vier cytoplasmatischen Serin-Dupletts durch eine PK C Isoform oder eine PK C-aktivierte Kinase (Widmann et al., 1996). Die gleichen Autoren beschreiben, daß die homologe Desensitivierung (Auslösung durch den Agonisten) ebenso die Phosphorylierung von jedoch nur drei cytoplasmatischen Serin-Dupletts verursachte. Die cAMP-Bildung wurde durch die Phosphorylierung der Serin-Reste gehemmt (Widmann et al., 1997). Glucagon induzierte die Phosphorylierung von Serin-Resten in der cytoplasmatischen Domäne des Glucagon-Rezeptors. Die direkte Beteiligung der PK A oder PK C wurde nicht nachgewiesen (Heurich et al., 1998). Die PK C war an der Hemmung der glucagon-stimulierten PCK1-Genexpression durch IL6 in primär kultivierten Rattenhepato-cyten beteiligt (Christ et al., 2000).

Der Glucagon-Rezeptor enthält mehrere Serin- und Threonin-Reste in der zweiten cytoplasmatischen Schleife, während in der dritten Schleife nur Tyrosin-Reste phosphoryliert werden könnten (Abb. 26). Die Sequenzen der Phosphorylierungsstellen zeigen innerhalb der Familie der Protein-Kinasen eine große Variabilität, so daß sich keine Konsensus-Sequenz für spezifische Protein-Kinasen angeben läßt. In vielen Phosphorylierungssequenzen befinden sich jedoch mehrere Serin- und Threonin-Reste nebeneinander, so

daß multiple und kooperative Phosphorylierungen in einem Sequenzabschnitt möglich sind (Krauss, 1997).

IL6 könnte somit einerseits über spezifische Serin-/Threonin-Kinasen die Phosphorylierung dieser Reste in der zweiten cytoplasmatischen Schleife induzieren. Andererseits könnte IL6 aber auch über Tyrosin-Kinasen die Tyrosin-Reste in der dritten Schleife phosphorylieren. Die Phosphorylierung in der cytoplasmatischen Domäne des Glucagon-Rezeptors könnte die Bindung zum G-Protein verstärken. Dadurch wird die Affinität zwischen dem Liganden und dem Rezeptor erhöht. Dieser Mechanismus würde dazu führen, daß der Austausch von GDP zu GTP am G-Protein noch stattfinden, aber die Dissoziation des aktivierten G-Proteins vom Rezeptor und der Zerfall in $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ verhindert und somit die intrazelluläre Signaltransduktion unterbrochen würde (Abb. 27).

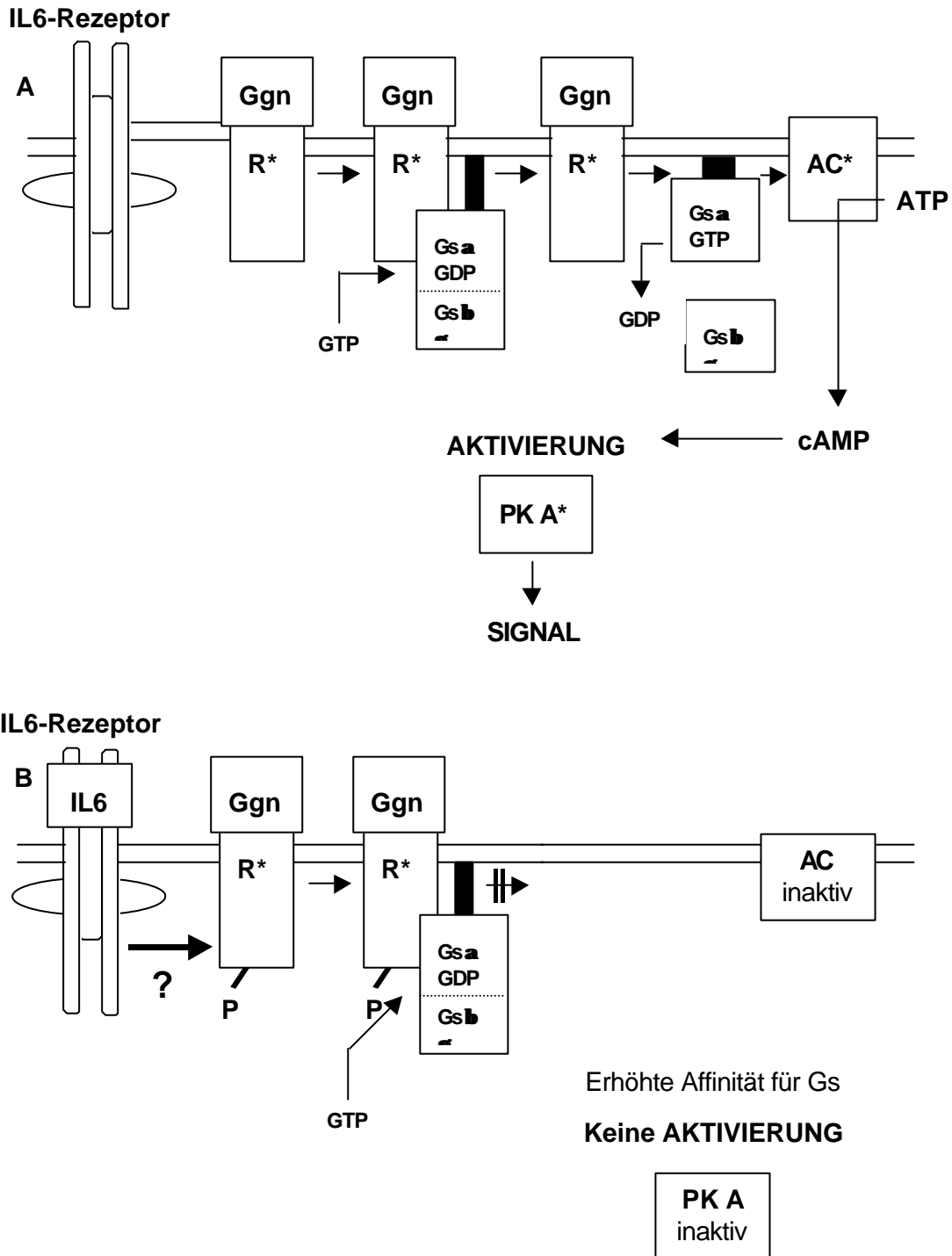


Abb. 27: Schematisches Modell der Desensitivierung des Glucagon-Rezeptors.
 A: Von einem aktivierten Rezeptor (R*) ausgehend wird das Signal über die Gs α -Untereinheit des G-Proteins an die Adenylatzyklase weitergegeben. Die Adenylatzyklase wird aktiviert (AC*) und bildet cAMP. Dieses aktiviert die PK A (PK A*), die das Signal in Form einer Ser/Thr-spezifischen Proteinphosphorylierung an Substratproteine weitergibt.
 B: IL6 bewirkt über eine unbekannte Kinase die Phosphorylierung des liganden-gebundenen Rezeptors. Der phosphorylierte Rezeptor bindet verstärkt das G-Protein, so daß die Dissoziation und der Zerfall in Gs α und Gs β verhindert wird. Die intrazelluläre Signaltransduktion ist unterbunden.

5.2 Hemmung der Glucagon-Wirkung durch IL6 auf der Ebene des Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-1-Gens

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß sowohl die glucagon- als auch die isoproterenol-stimulierte endogene PCK1-Genexpression durch IL6 gehemmt wurde (Abb. 11). Transgene Luciferasekonstrukte unter der Kontrolle des PCK1-Genpromotors wurden in kultivierten Rattenhepatocyten jedoch nicht durch IL6 gehemmt. IL6 verstärkte die cAMP-induzierte Expression des Luciferasegens unter der Kontrolle der PCK1-Promotorfragmente bis -979 bp und -1038 bp. Es hatte keinen Einfluß auf die cAMP-induzierte Expression des Luciferasegens unter der Kontrolle der PCK1-Promotorfragmente bis -1068 bp, bis -1149 bp und bis -2500 bp. Im Bereich von -1042 bis -1051 bp wurde eine C/EBP-Bindungsstelle identifiziert, die die Verstärkung im Bereich bis -1038 bp der cAMP-induzierten Stimulation des PCK1-Genpromotors durch IL6 aufhob.

5.2.1 Regulation der PCK1-Genexpression durch Transkriptionsfaktoren

Der Promotor des PCK1-Gens der Ratte ist innerhalb von 500 bp stromaufwärts vom Transkriptions-Startpunkt funktionell sehr gut charakterisiert (Lemaigre et al., 1994; Hanson et al., 1997). Darüber hinaus wurde 4800 bp stromaufwärts zum proximalen Promotor ein weiteres regulatorisches Element identifiziert (Ip et al., 1990). Sieben cis-Elemente, P1 bis P6 und CRE 1 (Roesler et al., 1989), sowie unterschiedliche trans-agierende Faktoren regulieren die gewebsspezifische Expression, die durch Hormone gesteuerte Expression und die Expression der PCK1 im Verlaufe der Entwicklung (Abb. 1). Die Elemente P3 und P4 sind nochmals unterteilt, wobei das P3(I) Element eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung der Transkription des PCK1-Gens spielt. Zum einen binden an dieses Element nur Transkriptionsfaktoren der Familie der „CCAAT/Enhancer binding proteins“ (C/EBP) (Hanson et al., 1997), zum anderen vermitteln P3(I) und CRE-1 gemeinsam die basale Transkription des PCK1-Gens (Liu et al., 1991). Die PCK1-Genexpression wird im wesentlichen von verschiedenen C/EBP-Isoformen reguliert (Hanson und Reshef, 1997). Obwohl der PCK1-Genpromotor der Ratte zu den am besten charakterisierten Promotoren zählt, sind bisher keine Cytokin responsiven Elemente identifiziert worden.

Die PCK1-Genexpression wird u.a. über die cAMP-abhängige Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP response element binding protein) stimuliert (Gurney et al., 1994). IL6 hemmte sowohl die glucagon- als auch die isoproterenol-stimulierte PCK1-Genexpression (Abb. 11), sowie auch die glucagon- nicht aber die isoproterenol-stimulierte cAMP-Bildung (Abb. 12B, 13B). Daher ist davon auszugehen, daß der Angriffspunkt der Hemmung nach der cAMP-Bildung liegen kann. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde in primär kultivierten Rattenhepatocyten gezeigt, daß die endogene PCK1-Genexpression durch ein nicht-hydrolysierbares cAMP-

Analogon stimuliert und durch IL6 gehemmt wird (Christ et al., 1997). Im septischen Rattenmodell war sowohl die PCK1-mRNA-Expression als auch die PCK1-Aktivität reduziert (Hill et al., 1991; Deutschmann et al., 1993; Goto et al., 1994). Als Regulator der in Mäusen und Ratten induzierten Sepsis und einer damit einhergehenden verminderten PCK1-Genexpression wurde $\text{TNF}\alpha$ identifiziert (Hill et al., 1992; Chang et al., 1996). Weiterhin wurde gezeigt, daß trotz hoher cAMP-Konzentrationen in Gegenwart von LPS die PCK1-Genexpression nicht induziert werden kann (Wang et al., 1995).

Die Expression eines weiteren glucogenen Enzyms, der Glucose-6-Phosphatase, wurde im septischen Rattenmodell (Andrejko und Deutschmann, 1997; Deutschmann et al., 1997), in $\text{TNF}\alpha$ -behandelten Mäusen (Metzger et al., 1997) und in Mäusen mit transplantierten IL6-sezernierenden Tumoren gehemmt (Metzger et al., 1997). Demnach beruht die Reduktion der Gluconeogenese sowohl auf der Hemmung der PCK1- als auch der Glucose-6-Phosphatase-Genexpression durch proinflammatorische Cytokine. Die Hemmung der PCK1-Genexpression ist dabei unabhängig vom Abfall der intrazellulären cAMP-Konzentration. IL6 könnte direkt über die Aktivierung von inhibitorischen Transkriptionsfaktoren wirken.

5.2.2 Regulation der Genexpression durch IL6

IL6 aktiviert den JAK-STAT-Signalweg, indem zunächst die Janus-Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 die cytoplasmatische gp130-Domäne phosphorylieren. Die STAT-Faktoren STAT1 und STAT3 binden an phosphorylierte Tyrosinreste der gp130-Domäne (Stahl et al., 1995; Gerhartz et al., 1996) und werden ebenfalls phosphoryliert. Phosphorylierte STAT-Faktoren bilden Dimere, wandern in den Zellkern und regulieren dort die Transkription verschiedener Gene (Hibi et al., 1996), z.B. der Akut-Phase-Proteine (Heinrich et al., 1998). Neben den erwähnten Tyrosin-Kinasen wird eine Beteiligung unbekannter Serin-Kinasen an der Cytokin-induzierten Aktivierung der STAT-Faktoren diskutiert (Wen et al., 1995; Zhang et al., 1995; Lütticken et al., 1995). Die Tyrosin-Kinasen der Cytokin-Rezeptoren können über Adaptermoleküle mit dem zur Familie der kleinen G-Proteine gehörigen Ras-Protein verknüpft werden, so daß der MAP-Kinase Signalweg, respektive bisher nicht identifizierte Serin/Threonin-Kinasen, stimuliert wird (Hibi und Hirano, 1998; Schumann et al., 1999). Verschiedene Transkriptionsfaktoren, u.a. CREB, werden so phosphoryliert und aktiviert (McCubrey et al., 2000). In Prostata-Krebszellen wurde die PI3-Kinase durch IL6 aktiviert (Qui et al., 1998), und auch in primär kultivierten Leberzellen wurde eine Beteiligung der PI3-Kinase an der Hemmung der PCK1-Genexpression durch IL6 nachgewiesen (Christ et al., 2000). IL6 hemmte die $\text{TGF}\beta$ -induzierte Apoptose über die Aktivierung der PI3-Kinase in Hepatom-Zellen (Chen et al., 1999) (Abb. 28).

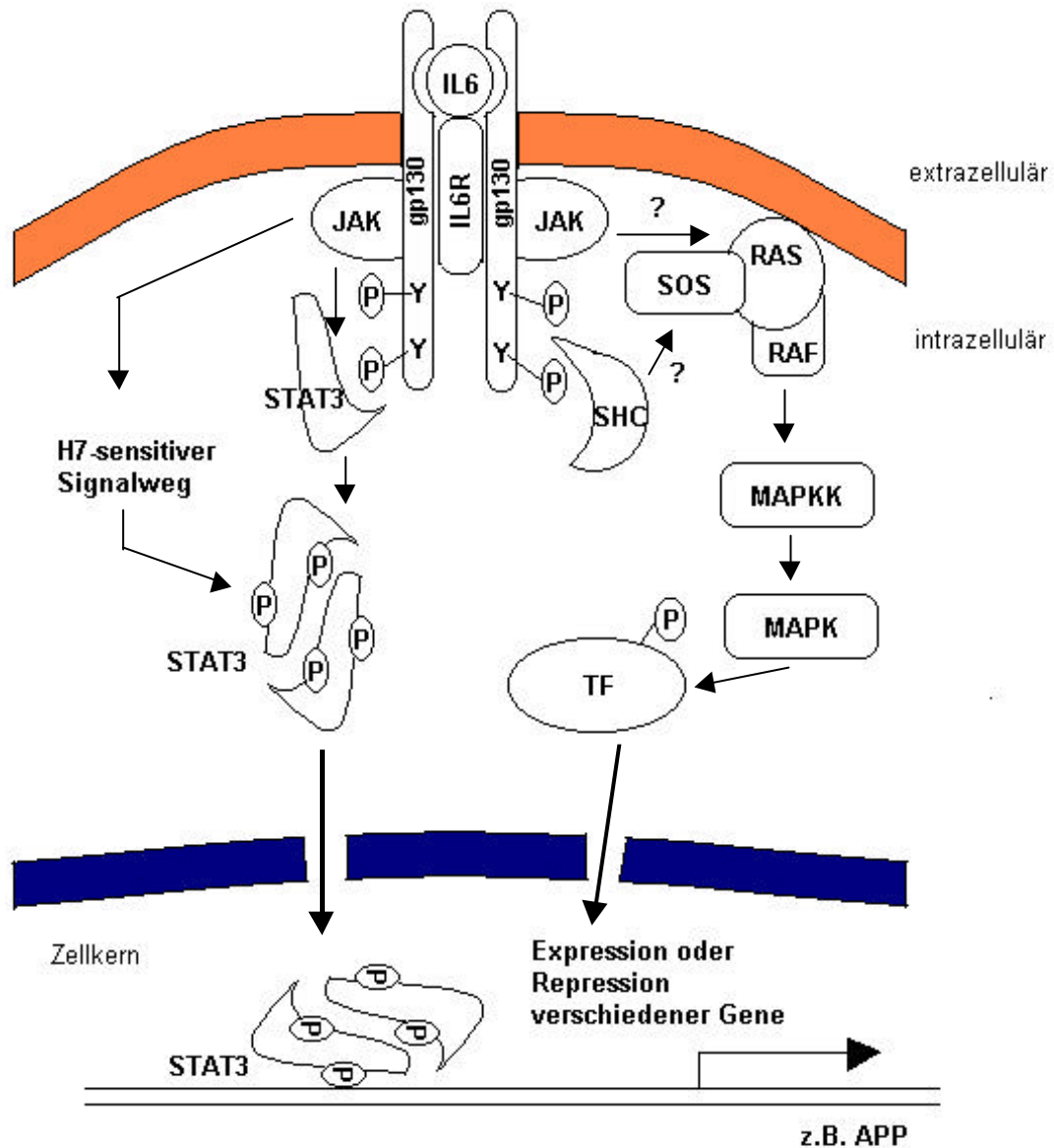


Abb. 28: Schematische Darstellung des IL6-Signalweges. Das IL6-Signal wird über gp130, den JAK-STAT und andere Wege, an denen möglicherweise kleine GTP-bindende Proteine wie RAS beteiligt sind, über RAF, MAPKK und MAPK weitergeleitet. Der H7-sensitive Signalweg ist an der Phosphorylierung von Serin-Resten und an der Aktivierung von STAT3 beteiligt. H7 ist ein Serin/Threonin-Protein-Kinase Inhibitor. Abkürzungen: APP: Akut-Phase-Proteine; JAK: Januskinase; STAT: „signal transducers and activators of transcription“; SHC: Adapter-Protein; SOS: son of sevenless, Adapter-Protein; RAS: kleines G-Protein aktiviert RAF: Protein-Kinase; MAPK: Mitogen aktivierte Proteinkinase; MAPKK: MAPK-Kinase; TF: Transkriptionsfaktor (nach Hibi et al., 1996).

Die durch Janus-Kinasen stimulierten Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie dimerisieren (Shuai et al., 1994), bevor sie an die DNA-Konsensussequenz TTN₅AA binden (Schindler et al., 1995; Seidel et al., 1995). IL6-responsive Elemente sind in den regulatorischen Regionen der APP-Gene beschrieben, deren Expression durch IL6 stimuliert wird (Akira und Kishimoto, 1992; Baumann et al., 1989). Diese IL6-responsiven Elemente wurden in zwei Typen gegliedert: Typ 1 ist durch die Konsensussequenz T(T/G)NNGNAA(T/G), Typ 2 durch das Hexanukleotid-Motiv CTGGGA charakterisiert. Während an den Typ 2 auch Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie binden (Hocke et al., 1992; Wegenka et al., 1993), bindet der Typ 1 der IL6-responsiven Elemente Proteine aus der „CCAAT/Enhancer-binding protein“-Familie. Hierzu gehört vor allem der Transkriptionsfaktor C/EBP β , der synonym auch als NF-IL6, LAP oder IL-6DBP bezeichnet wird (Akira et al., 1990; Lekstromes-Himes und Xanthopoulos, 1998).

5.2.3 CCAAT/Enhancer-Binding Proteine (C/EBP) – mögliches Bindeglied zwischen IL6- und Glucagon-regulierter Genexpression

C/EBP-Familie

C/EBP stellen eine Familie von Transkriptionsfaktoren mit strukturellen und funktionellen Homologien dar, die substantiell für die Differenzierung verschiedener Zelltypen sind. Diese Transkriptionsfaktoren bestehen aus einer aktivierenden Domäne, einer DNA-bindenden basischen Region und einer Leucin-reichen Dimerisierungsdomäne. Die Hetero- oder Homodimerisierung zweier Transkriptionsfaktoren ist eine notwendige Voraussetzung für die DNA-Bindung (Landschulz et al., 1989). Alle C/EBP-Proteine vermitteln über N-terminal lokalisierte Domänen die transkriptionelle Aktivierung und/oder Repression (Lekstrom-Himes und Xanthopoulos, 1998). Die Anreicherung von C/EBP-Proteinen in der Leber und im Fettgewebe unterstützt die Hypothese, daß diese Faktoren maßgeblich an der Regulation des Energiehaushaltes beteiligt sind (Birkenmeier et al., 1989; Descombes et al., 1990; McKnight et al., 1989).

Die C/EBP-Familie besteht aus den Transkriptionsfaktoren C/EBP α , β , γ , δ , ϵ und ζ (Cao et al., 1991), wobei C/EBP α und β in der Leber hauptsächlich die Zelldifferenzierung und die Transkription hepatischer Gene regulieren. Der Transkriptionsfaktor C/EBP α war der erste klonierte Transkriptionsfaktor dieser Familie (Landschulz et al., 1988) und wird unter physiologischen Bedingungen am stärksten im differenzierten Gewebe exprimiert (Antonson und Xanthopoulos, 1995). Demgegenüber wird die C/EBP β -Expression durch Lipopolysaccharide, IL6, IL1, Dexamethason und Glucagon induziert (Akira et al., 1990; An et al., 1996; Alam et al., 1992; Matsuno et al., 1996).

C/EBP-Transkriptionsfaktoren und PCK1-Genexpression

Obwohl der PCK1-Genpromotor funktionell gut charakterisiert ist, sind bisher keine Cytokin-responsiven Elemente beschrieben. Die Regulation der PCK1-Genexpression durch cAMP erfolgt vor allem über die Elemente CRE1 und P3 und die daran bindenden Transkriptionsfaktoren CREB und C/EBP (Hanson et al., 1997). Während unter physiologischen Bedingungen C/EBP α exprimiert wird, ist im Verlauf einer Sepsis die C/EBP α -Expression gehemmt, gleichzeitig wird jedoch die C/EBP β -Expression stimuliert. Die Affinität des Transkriptionsfaktors C/EBP β zu den in Akut-Phase-Proteinen (APP) häufig vorkommenden CCAAT-Sequenzen ist deutlich höher als die des Transkriptionsfaktors C/EBP α und korreliert daher mit der Aktivierung dieser Gene (Alam et al., 1992).

Im Verlauf einer Sepsis wird also C/EBP α gegen C/EBP β ersetzt. Beide Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie sind sowohl für die Induktion der PCK1-Genexpression als auch für die IL6-stimulierte Expression der Akut-Phase-Proteine von entscheidender Bedeutung. Damit spielen diese Faktoren eine wichtige Rolle bei der Interpretation leberspezifischer Leistungen. Man könnte also vermuten, daß während einer Akut-Phase-Reaktion für die Stimulation der Akut-Phase-Protein-Synthese durch IL6 in erhöhtem Maße Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie benötigt werden, die dann nicht mehr für die Stimulation der PCK1-Genexpression zur Verfügung stehen. Die somit verminderte PCK1-Genexpression hat die Verminderung der Gluconeogenese und die verminderte hepatische Glucosebereitstellung zur Folge. Die reziproke Expression der PCK1 und den APP ist auch im septischen Rattenmodell beschrieben (Deutschmann et al., 1995; Wang et al., 1995).

C/EBP β : Mediator der IL6-induzierten Signaltransduktion

Das Expressionsmuster der C/EBP-Isoformen veränderte sich nach partieller Hepatektomie drastisch. Während die Expression der C/EBP α -Isoform deutlich vermindert war (Mischoulon et al., 1992; Flodby et al., 1993), wurde ein Anstieg der C/EBP β -mRNA nachgewiesen (Diehl et al., 1995; Michalopoulos und DeFrances, 1997).

C/EBP β wurde als Mediator der IL6-induzierten Signaltransduktion identifiziert. Dieser Transkriptionsfaktor bindet an IL6-responsive Elemente in den Promotoren verschiedener APP-Gene (Akira et al., 1990; Poli et al., 1990). IL1 und LPS sind ebenfalls an der Stimulation der Akut-Phase-Reaktion beteiligt. Beide Cytokine induzieren die C/EBP β -Transkription (Alam et al., 1992). Weiterhin erhöhen Cytokine die C/EBP β -Aktivität auf der Ebene der Transkription, indem sie die DNA-Bindung verstärken (Poli et al., 1992; Diehl et al., 1995). Diese Daten belegen, daß C/EBP β eine wesentliche Rolle als inflammatorischer Mediator spielt.

Defekte der Regulation der Glucose-Homöostase in C/EBP-Knockout Mäusen

Mit Hilfe von C/EBP-Knockout Modellen wurde die Bedeutung der Expression spezifischer C/EBP-Isoformen gezeigt. C/EBP α ist essentiell für die Regulierung der hepatischen Genexpression, da in C/EBP α -/- Mäusen die perinatale Induktion gluconeogener Enzyme gehemmt war. Als Folge schwerer Hypoglykämien verstarben die Mäuse direkt nach der Geburt. Diese metabolische Entgleisung des Kohlenhydratstoffwechsel wurde einerseits auf reduzierte hepatische Glykogenspeicher infolge der verminderten Expression der Glykogen-Synthase zurückgeführt; andererseits war sowohl die PCK1- als auch die Glucose-6-Phosphatase-Expression signifikant reduziert (Wang et al., 1995). Dieser perinatal letale Phänotyp wurde auch in C/EBP β -/- Mäusen nachgewiesen (Croninger et al., 1997). In adulten C/EBP β -/- Mäusen war die hepatische Glucosefreisetzung sowohl aus Glykogenspeichern als auch durch Gluconeogenese deutlich vermindert (Arizmendi et al., 1999; Liu et al., 1999). Demnach ist der Transkriptionsfaktor C/EBP β offensichtlich an der Regulation der Glucose-Homöostase beteiligt.

5.2.4 Mechanismus der Verstärkung der cAMP-stimulierten Aktivierung des PCK1-Promotors durch IL6 in den Luciferase-Reportertragenen PCKprom-979/+32 und PCKprom-1038/+32

Die Transkription des Gens für die PCK1 wird durch cAMP stimuliert; diese Stimulation wird durch verschiedene Elemente im Promotor vermittelt, wobei das cAMP-responsive Element (CRE1), die P3(l)-Stelle und die AP1-Bindungsstelle involviert sind (Liu et al., 1991; Roesler et al., 1995). Dementsprechend regulieren Transkriptionsfaktoren der CREB-, AP1- und C/EBP-Familie die PCK1-Expression (Roesler et al., 1996). Die Induktion der PCK1 erfordert eine komplexe Interaktion zwischen DNA-bindenden Proteinen und deren spezifischen cis-regulatorischen Sequenzen. Damit die cAMP-Antwort vollständig erfolgt, muß neben dem CRE1- auch das P3(l)-Element durch Transkriptionsfaktoren aktiviert werden (Liu et al., 1991; Patel et al., 1994). An das CRE1-Element bindet aktiviertes, phosphoryliertes CREB und stimuliert so die PCK1-Genexpression (Hanson und Reshef, 1997). Es können aber in gleicher Weise sowohl C/EBP α als auch die β -Isoform an das CRE1- und das P3(l)-Element binden (Park et al., 1990 und 1993). C/EBP α kann in Abwesenheit von CREB die cAMP-induzierte PCK1-Transkription aktivieren (Park et al., 1997; Roesler et al., 1996 und 1998). Crosson und Roesler (2000) haben gezeigt, daß nur die α -Isoform cAMP-Effekte vermittelt. Es wurde jedoch auch nachgewiesen, daß die Bindung von C/EBP β an den PCK1-Promotor durch cAMP erhöht werden kann. Die C/EBP β -Konzentrationen in der Leber stiegen nach cAMP-Injektion der Tiere schnell an und die Bindung von C/EBP β an das P3(l)-Element wurde erhöht (Nizielski et al., 1996). In Mäusen, die physischem Streß ausgesetzt waren und somit vermehrt Katecholamine synthetisierten, wurde eine erhöhte Gluconeogeneserate,

einhergehend mit einer gesteigerten PCK1-Transkriptionsrate, nachgewiesen (Friedmann, 1994).

IL6 stimuliert die C/EBP β -Bildung (Akira et al., 1990). Damit könnte die Verstärkung der cAMP-induzierten PCK1-Transkription der PCK1-Promotorfragmente bis einschließlich -1038 bp durch IL6 darauf zurückzuführen sein, daß vermehrt C/EBP β gebildet wird. Die erhöhten C/EBP β -Konzentrationen binden in verstärktem Maße an das P3(I)-Element und stimulieren so die Transkription des PCK1-Gens. Gleichzeitig könnte man aber auch über einen kooperativen Mechanismus spekulieren, wobei IL6-aktivierte Transkriptionsfaktoren auch an die Elemente P1 und CRE1 binden und die Aktivierung cAMP-stimulierter Transkriptionsfaktoren verstärken könnten.

5.2.5 Mechanismus der Aufhebung der Verstärkung der cAMP-stimulierten Aktivierung des PCK1-Promotors durch IL6 in den Luciferase-Reportergeneten PCKprom-1068/+32, PCKprom-1149/+32 und PCKprom-2500/+32

Modell der kooperativen Regulierung der PCK1-Genexpression durch multiple cis- und trans-agierende Faktoren

Während die cAMP-induzierte Stimulation des PCK1-Promotors bis -1038 bp durch IL6 noch verstärkt wurde, hatte IL6 keinen Einfluß mehr auf die cAMP-induzierte Stimulation der längeren PCK1-Promotorfragmente von -1068 bis -2500 bp. Bisher sind bis auf ein cis-regulatorisches Element bei -4800 bp (Ip et al., 1990) neben den schon genannten Elementen im Bereich bis zu -500 bp keine weiteren Elemente beschrieben worden (Hanson und Reshef, 1997). Es könnte möglich sein, daß stromaufwärts von -1038 bp cis-regulatorische Elemente lokalisiert sind, die die Verstärkung der cAMP-induzierten PCK1-Genexpression durch IL6 im Bereich bis -1038 bp aufheben. Anhand computer-gestützter Sequenzanalysen ließ sich im Bereich -1051 bis -1043 bp eine potentielle C/EBP β -Bindungsstelle identifizieren; dieser Sequenzbereich ist zu 78 % homolog dem Typ 1 der IL6-responsiven Elemente (Kasutani et al., 1998). Die Verstärkung der cAMP-induzierten PCK1-Genexpression durch IL6 konnte durch Mutation dieser potentiellen C/EBP β -Bindungsstelle teilweise wiederhergestellt werden. Man kann also annehmen, daß im Promotorbereich ohne die potentielle C/EBP-Bindungsstelle bei -1051/-1043 bp IL6 die cAMP-stimulierte PCK1-Genexpression durch erhöhte C/EBP β -Wirkung an den Elementen CRE1 und/oder P3(I) verstärkt. Ist jedoch die zusätzliche C/EBP β -Bindungsstelle bei -1051/-1043 bp im Promotor enthalten, wird die durch IL6 verstärkte cAMP-induzierte Aktivierung des PCK1-Genpromotors abgeschwächt, indem C/EBP β an dieses Element bindet. Daher könnte die C/EBP β -Bindungsstelle bei -1051/-1043 bp möglicherweise als Silencer wirken (Abb. 29). Bisher gibt es jedoch keine Literaturdaten, die belegen, daß der Transkriptionsfaktor C/EBP β als Silencer wirkt. Weiterhin ist bis heute kein Mechanismus beschrieben, bei dem ein Transkriptionsfaktor die Expression eines Gens gleichzeitig positiv wie auch negativ reguliert.

Da keine Hemmung der Luciferase-Genexpression unter Kontrolle des PCK1-Genpromotors bis -2500 bp festgestellt wurde, muß die Hemmung der endogenen PCK1-Genexpression (Abb. 11) über Bereiche reguliert werden, die stromaufwärts von 2500 bp liegen.

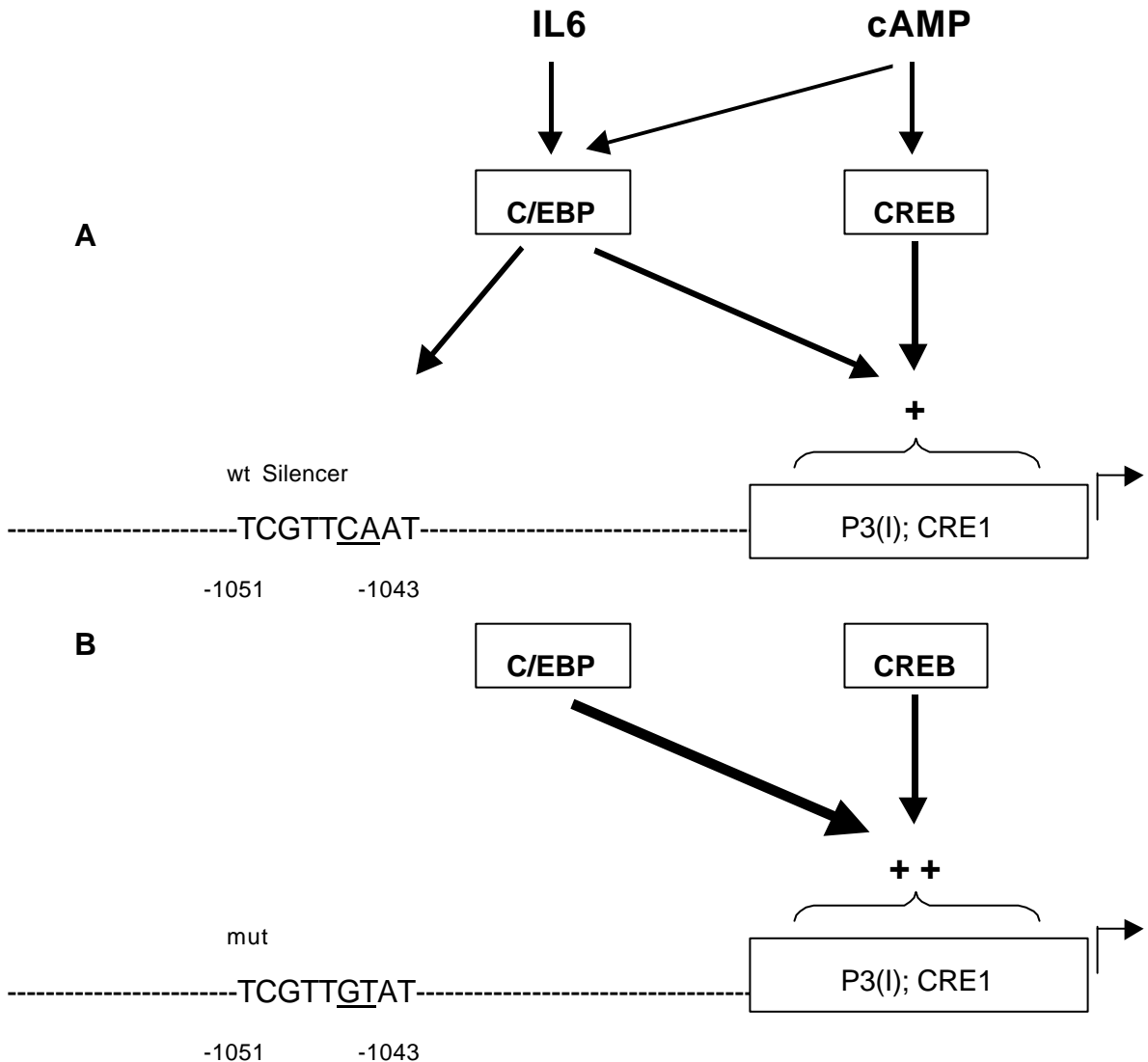


Abb. 29: Abschwächung der cAMP-abhängigen Aktivierung des PCK1-Gens durch IL6 durch Wirkung über eine potentielle C/EBP-Bindungsstelle (A) und Verstärkung durch Wirkung über P3(I) und CRE1 (B). IL6 und cAMP stimulieren die Bildung der Transkriptionsfaktoren C/EBP und CREB, die den PCK1-Promotor bis -979 bp aktivieren. Die Verstärkung der cAMP-induzierten Expression des PCK1-Promotors bis -979 bp durch IL6 ist im Promotor bis -1149 bp nicht beobachtet worden. A: Die Region von -1043 bis -1051 bp wurde als Silencer identifiziert. Die Sequenz weist Homologien zu bekannten C/EBP-Sequenzen auf. C/EBP kann hier binden und die Verstärkung der cAMP-induzierten Expression des PCK1-Promotors bis -979 bp durch IL6 aufheben. B: Wird die Sequenz mutiert (Basenaustausch von CA nach GT), verstärkt IL6 die cAMP-stimulierte PCK1-Genexpression über die Elemente P3(I) und CRE1.

5.3 Bedeutung des IL6-Glucagon-Antagonismus für die Pathogenese der Hypoglykämie im septischen Schock

Die Hauptkomplikation in der Pathogenese des septischen Schocks ist die auftretende Hypoglykämie infolge einer prolongierten Sepsis. Verursacht wird die Hypoglykämie vor allem durch die erhöhte Glucoseutilisation der peripheren Organe bei gleichzeitig stark verminderter Glucosebereitstellung durch die Leber (Filkins, 1985; Goto et al., 1994; Memon et al., 1994; Mizock et al., 1995). Die verminderte Glucosebereitstellung durch die Leber ist hauptsächlich auf die Hemmung der PCK-Genexpression durch proinflammatorische Cytokine zurückzuführen (Hill und McCallum, 1991; Deutschmann et al., 1993; Christ et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß der glucagon-stimulierte Glykogenabbau durch IL6 deutlich gehemmt wurde (Abb. 14, 16). Übereinstimmend mit diesem Ergebnis wurde auch in Hepatocyten, die 24 h mit verschiedenen inflammatorischen Cytokinen behandelt worden waren, die glucagon-stimulierte Glykogenolyse gehemmt (Ceppi et al., 1996). Somit könnte die verminderte Glucosebereitstellung der Leber im Verlaufe einer Sepsis zusätzlich auch auf die Hemmung der Glykogenolyse zurückzuführen sein.

Bemerkenswert ist jedoch, daß IL6 ein hormonelles Milieu schafft, daß eigentlich die Glucosefreisetzung fördern sollte. Die Gabe von IL6 an Freiwillige erhöhte den Plasmaglucagon-Spiegel (Tsigos et al., 1997). Im Plasma Krebskranker, denen IL6 infundiert wurde, wurden ebenfalls erhöhte Konzentrationen an Noradrenalin, Cortisol und Glucagon nachgewiesen (Stouthard et al., 1995). Sowohl in septischen Ratten (Hill und McCallum, 1991; Byerly et al., 1992) als auch in Ratten, denen intravenös IL6 gespritzt wurde (Stith und Luo, 1994), konnte ein Anstieg der Glucagon-Konzentration im Plasma beobachtet werden. Daher ist anzunehmen, daß die verminderte Glucosebereitstellung durch die Leber während einer prolongierten Sepsis vermutlich durch eine IL6-vermittelte Hemmung des Glucagon-Rezeptors verursacht wird. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit wird geschlossen, daß der Glucagon-Rezeptor Hauptangriffspunkt der IL6-Wirkung ist, die in der funktionellen Inaktivierung des Rezeptors besteht. Ein weiteres Ziel der Cytokinwirkung ist der PCK-Genpromotor, dessen glucagon-stimulierte transkriptionelle Aktivierung durch IL6 inhibiert wird.

5.4 Ausblick

In weiteren Untersuchungen soll mit Hilfe von Glucagon-Rezeptormutanten aufgeklärt werden, ob Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Reste in der intrazellulären Domäne des Rezeptors durch IL6 phosphoryliert werden könnten und ob so die intrazelluläre Signaltransduktion inhibiert wird. Zusätzlich könnten Co-Immunpräzipitationen zwischen dem Glucagon-Rezeptor und dem stimulatorischen G-Protein Hinweise liefern, ob IL6 die Interaktion dieser Proteine beeinflusst.

Der Mechanismus der Hemmung der cAMP-stimulierten PCK1-Genexpression durch IL6 soll mit Reporter-Gen-Konstrukten unter der Kontrolle von PCK1-Promotorfragmenten, die deutlich größer als -2500 bp sind, untersucht werden. Weiterhin sollen die an der Regulation der PCK1-Genexpression durch IL6 beteiligten Proteine anhand von Dnase I Footprints mit den größeren Promotorfragmenten und dann mit entsprechenden Electrophoretic Mobility Shift Assays charakterisiert werden.

- Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T (1990):** A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J* 9: 1897-1906
- Akira S, Kishimoto T (1992):** IL-6 and NF-IL6 in acute phase response and viral infection. *Immunol Rev* 127: 25-50
- Alam T, An MR, Papaconstantinou J (1992):** Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response. *JBC* 267: 5021-5024
- An MR, Hsieh CC, Reisner PD, Rabek JP, Scott SG, Kuninger DT, Papaconstantinou J (1996):** Evidence for posttranscriptional regulation of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression during the lipopolysaccharide-mediated acute-phase response. *Mol Cell Biol* 16: 2295-2306
- Antonson P, Xanthopoulos KG (1995):** Molecular cloning, sequence, and expression patterns of the human gene encoding CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBPalpha). *BBRC* 215: 106-113
- Andrejko KM, Deutschmann CS (1997):** Altered hepatic gene expression in fecal peritonitis: changes in transcription of gluconeogenic, beta-oxidative, and ureagenic genes. *Shock* 7: 164-169
- Arizmendi C, Liu S, Croninger C, Poli V, Friedmann JE (1999):** The transcription factor CCAAT/Enhancer-binding protein β regulates gluconeogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription during diabetes. *JBC* 274: 13033-13040
- Banauch D, Brümmer W, Ebeling W, Metz H, Rindfrey H, Lang H, Leybold K, Rick W, Staudinger HJ (1975):** A glucose dehydrogenase for the determination of glucose concentration in body fluids. *Z Klin Chem Biochem* 13: 101-107
- Battelino T, Goto M, Krzysnik C, Zeller WP (1999):** Tumor necrosis factor-alpha alters glucose metabolism in suckling rats. *J Lab Clin Med* 133: 583-589
- Baumann H, Prowse KR, Marinkovic S, Won KA, Jahreis GP (1989):** Stimulation of hepatic acute phase response by cytokines and glucocorticoids. *Ann NY Acad Sci* 557: 280-296
- Baumann H, Gauldie J (1994):** The acute phase response. *Immunology Today* 15: 74-80
- Beale EG, Chrapkiewicz NB, Scoble HA, Metz RJ, Quick DP, Noble RL, Donelson JE, Biemann K, Granner DK (1985):** Rat hepatic cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). Structures of the protein, mRNA, and gene. *JBC* 260: 10748-10760
- Blumberg D, Hochwald S, Brennan MF, Burt M (1995):** Interleukin-6 stimulates gluconeogenesis in primary cultures of rat hepatocytes. *Metabolism* 44: 145-146

- Boyer PD (1982):** The enzyme. Academic Press 15: Part B
- Bünemann M, Hosey MM (1999):** TG-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J Physiol* 517: 5-23
- Buggy JJ, Livingston JN, Rabin DU, Yoo-Warren H (1995):** Glucagon-like peptide I receptor chimeras reveal domains that determine specificity of glucagon binding. *JBC* 270: 7474-7478
- Burcelin R, Katz EB, Charron MJ (1996):** Molecular and cellular aspects of the glucagon receptor: role in diabetes and metabolism. *Diabet and Metab* 22: 373-396
- Byerley LO, Alcock NW, Starnes HF (1992):** Sepsis-induced cascade of cytokine mRNA expression: correlation with metabolic changes. *Am J Physiol* 261: E728-E735
- Cao Z, Umek RM, McKnight SL (1991):** Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5: 1538-1552
- Carruthers CJL, Unson CG, Kim NH, Sakmar TP (1994):** Synthesis and expression of a gene for the rat glucagon receptor. *JBC* 269: 29321-29328
- Castell JV, Andus T, Kunz D, Heinrich PC (1989):** The major regulator of acute-phase synthesis in man and rat. *Ann NY Acad Sci* 557: 87-99
- Ceppi ED, Titheradge MA (1998):** The importance of nitric oxide in the cytokine-induced inhibition of glucose formation by cultured hepatocytes incubated with insulin, dexamethasone, and glucagon. *Arch Biochem Biophys* 349: 167-174
- Chang CK, Gatan M, Schumer W (1996):** Efficacy of anti-tumor necrosis factor polyclonal antibody on phosphoenolpyruvate carboxykinase expression in septic and endotoxemic rats. *Shock* 6: 57-60
- Chen RH, Chang MC, Su YH, Tsai YT, Kuo ML (1999):** Interleukin-6 inhibits transforming growth factor- β -induced apoptosis through the PI3-kinase/akt and STAT3 pathways. *JBC* 274: 23013-23019
- Chicci GG, Graziano MP, Koch G, Hey P, Sullivan K, Vicario PP, Cascieri MA (1997):** Alterations in receptor activation and divalent cation activation of agonist binding by deletion of intracellular domains of the glucagon receptor. *JBC* 272: 7765-7769
- Chung MK, Gulick TS, Rotondo RE, Schreiner GF, Lange LG (1990):** Mechanism of cytokine inhibition of beta-adrenergic agonist stimulation of cyclic AMP in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 67: 753-763
- Chomczynski P, Sacchi N (1987):** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159
- Christ B, Nath A (1996):** Impairment by IL1 β and TNF α of the glucagon-induced phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenesis in cultured rat hepatocytes. *Biochem J* 320: 161-166

- Christ B, Nath A, Heinrich PC, Jungermann K (1994):** Inhibition by recombinant human interleukin-6 of the glucagon-dependent induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase and of the insulin-dependent induction of glucokinase gene expression in cultured rat hepatocytes: regulation of gene transcription and messenger RNA degradation. *Hepatology* 20: 1577-1583
- Christ B, Nath A, Jungermann K (1997):** Mechanism of the impairment of the glucagon-stimulated phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by IL6: inhibition of the increase in cAMP and the downstream cAMP-action. *Hepatology* 26: 73-80
- Christ B, Yazici E, Nath A (2000):** PI3-Kinase and PK C contribute to the inhibition by interleukin-6 of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in cultured rat hepatocytes. *Hepatology* 31: 461-468
- Croninger C, Trus M, Lysek-Stupp K, Cohen H, Liu Y, Darlington GJ, Poli V, Hanson RW, Reshef L (1997):** Role of the isoforms of CCAAT/enhancer-binding protein in the initiation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription at birth. *JBC* 272: 26306-26312
- Crosson SM, Roesler WJ (2000):** Hormonal regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. Role of specific CCAAT/enhancer-binding protein isoforms. *JBC* 275: 5804-5809
- Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972):** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 2110-2114
- Cypess CK, Unson CG, Wu CR, Sakmar TP (1999):** Two cytoplasmic loops of the glucagon receptor are required to elevate cAMP or intracellular calcium. *JBC* 274: 19455-19464
- Dahn MS, Ching JH, Lange PM, Jefferson LS (1994):** Effects of tumor necrosis factor- α on glucose and albumin production in primary cultures of rat hepatocytes. *Metabolism* 43: 476-480
- Deutschmann CS, DeMaio A, Buchmann TG (1993):** Sepsis induced alterations in phosphoenolpyruvate carboxykinase expression: the role of insulin and glucagon. *Circ Shock* 40: 295-302
- Deutschmann CS, DeMaio A, Clemens MG (1995):** Sepsis-induced attenuation of glucagon and 8-Br-cAMP modulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Am J Physiol* 269: 584-591
- Deutschmann CS, Andrejko KM, Haber BA, Bellin L, Elenko E, Harrison R, Taub R (1997):** Sepsis-induced depression of rat glucose-6-phosphatase gene expression and activity. *Am J Physiol* 273: 1709-1718
- De Blasi A (1990):** Beta-adrenergic receptors: structure, function and regulation. *Drugs Exp Clin Res* 16: 107-112

- Diehl AM, Yang SQ, Yin M, Lin HZ, Nelson S, Bagby G (1995):** TNF α modulates CCAAT/enhancer binding proteins-DNA binding activities and promotes hepatocyte-specific gene expression during liver regeneration. *Hepatology* 22: 252-261
- Ernst OP, Hofmann KP, Sakmar TP (1995):** Characterization of rhodopsin mutants that bind transducin but fail to induce GTP nucleotide uptake. Classification of mutant pigments by fluorescence, nucleotide release, and flash-induced light-scattering assays. *JBC* 270: 10580-10586
- Ferguson SSG, Caron MG (1998):** G protein-coupled receptor adaption mechanisms. *Cell & Devel Biol* 9: 119-127
- Flodby P, Antonson P, Barlow C, Blanck A, Porsch-Hallstrom I, Xanthopoulos KG (1993):** Differential patterns of expression of three C/EBP isoforms, HNF-1, and HNF-4 after partial hepatectomy in rat. *Exp Cell Res* 208: 248-256
- Franke RR, Sakmar TP, Graham RM, Khorona HG (1992):** Structure and function in rhodopsin. Studies of the interaction between the rhodopsin cytoplasmic domain and transducin. *JBC* 267: 14767-14774
- Forest CD, O'Brien RM, Lucas PC, Magnuson MA, Granner DG (1990):** Regulation of p-enolpyruvate carboxykinase gene expression by insulin. Use of stable transfection approach to locate an insulin responsive sequence. *Mol Endocrinol* 4: 1302-1310
- Friedmann JE, Yun JS, Patel Y, McGrane MM, Hanson RW (1993):** Glucocorticoids regulate the induction of p-enolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription during diabetes. *JBC* 268: 12952-12957
- Gether U, Kobilka BK (1998):** G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *JBC* 273: 17979-17982
- Gerhartz C, Heesel B, Sassa J, Hemmann U, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Horn F, Heinrich PC, Graeve L (1996):** Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *JBC* 271: 12991-12998
- Giralt M, Park AE, Liu J, Gurney A, Hanson RW (1991):** Identification of a thyroid hormone response element in the p-enolpyruvate carboxykinase (GTP) gene: evidence for a synergistic interaction between thyroid hormone and cAMP cis-regulatory elements. *JBC* 266: 21991-21996
- Goto M, Zeller WP, Lichtenberg RC (1994):** Decreased gluconeogenesis and increased glucose disposal without hyperinsulinemia in 10-day-old rats with endotoxic shock. *Metabolism* 43: 1248-1254
- Graham FL, van der Eb AJ (1973):** A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456-467

- Granner DK, Sasaki K, Cripe TP, Koch SR, Andreone TL, Petersen DD, Beale EG (1984):** Multihormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *JBC* 259: 15242-15251
- Granner DK, Magnusson MA, Quinn PG (1987):** Multihormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase-chloramphenicol acetyltransferase fusion genes. *JBC* 262: 14917-14920
- Grimaldi M, Meucci O, Scorzielle A, Florio T, Ventra C, De Mercato R, Schettini G (1992):** Interleukin-6 modulation of second messenger systems in anterior pituitary cells. *Life Sci* 51: 1243-1248
- Gurney AL, Park EA, Liu J, Giralt M, McGrane MM, Patel YM, Crawford DR, Nizielski SE, Savon S, Hanson RW (1994):** Metabolic regulation of gene transcription. *J Nutr* 124: 1533-1539
- Hanson R, Yyashomati M (1994):** Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP): the gene and the enzyme. *Ad Enz Mol Biol* 69: 203-281
- Hanson R, Reshef L (1997):** Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem* 66: 581-611
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T (1990):** Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265: 621-636
- Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Neven G, Schaper F, Graeve L (1998):** Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334: 297-314
- Heller SR, Timothy KJ, Habener JF (1996):** Point mutations in the first and third intracellular loops of the glucagon-like peptide-1 receptor alter intracellular signalling. *Biochem Biophys Res Com* 223: 624-632
- Heurich RO, Buggy JJ, Vandenberg MT, Rossomando AJ (1996):** Glucagon induces a rapid and sustained phosphorylation of the human glucagon receptor in chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Com* 220: 905-910
- Hibi M, Nakajima K, Hirano T (1996):** IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med* 74: 1-12
- Hibi M, Hirano T (1998):** Signal transduction through cytokine receptors. *Int Rev Immunol* 17: 75-102
- Hill M, McCallum R (1991):** Altered transcriptional regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following endotoxin treatment. *J Clin Invest* 88: 811-816
- Hill M, McCallum R (1992):** Identification of tumor necrosis factor as a transcriptional regulator of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene following endotoxin treatment of mice. *Infect Immun* 60: 4040-4050

- Hocke GM, Barry D, Fey GH (1992):** Synergistic action of interleukin-6 and glucocorticoids is mediated by the interleukin-6 response element of the rat alpha 2 macroglobulin gene. *Mol Cell Biol* 12: 2282-2294
- Holtmann MH, Hadac EM, Miller LJ (1995):** Critical contributions of amino-terminal extracellular domains in agonist binding and activation of secretin and vasoactive intestinal polypeptide receptors. *Studies of chimeric receptors. JBC* 270: 14394-14398
- Horwitz EM, Jenkins TW, Hoosein NM, Gurd RS (1985):** Kinetic identification of a two-state glucagon receptor system in isolated hepatocytes. *JBC* 260: 9307-9315
- Horwitz EM, Gurd RS (1988):** Quantitative analysis of internalization of glucagon by isolated hepatocytes. *BBA* 267: 758-769
- Hoosein NM, Gurd RS (1984):** Identification of glucagon receptors in rat brain. *PNAS* 81: 4368-4372
- Inglese J, Freedmann NJ, Koch WJ, Lefkowitz RJ (1993):** Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *JBC* 268: 23735-23738
- Inoue H, Yokoyama C, Hara S, Tone Y, Tanabe T (1995):** Transcriptional Regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by LPS and Phorbol ester in vascular endothelial cells. *JBC* 270: 24965-24971
- Ip TY, Poon D, Stone D, Granner DK, Chalkley R (1990):** Interaction of a liver-specific factor with an enhancer 4.8 kilobases upstream of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 10: 3770-3781
- Jelinek LJ, Lok S, Rosenberg GB (1993):** Expression cloning and signalling properties of the rat glucagon receptor. *Science* 259: 1614-1616
- Ji TH, Grossmann M, Ji I (1998):** G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand binding. *JBC* 273: 17299-17302
- Jungermann K, Katz N (1989):** Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol Rev* 69: 708-764
- Jungermann K, Kietzmann T (1996):** Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr* 16: 179-203
- Kasutani K, Itoh N, Kanekiyo M, Muto N, Tanaka K (1998):** Requirement for cooperative interaction of interleukin-6 responsive element type 2 and glucocorticoid responsive element in the synergistic activation of mouse metallothionein-1 gene by interleukin-6 and glucocorticoid. *Tox Appl Pharma* 151: 1143-1510
- Kinoshita S, Akira S, Kishimoto T (1992):** A member of the C/EBP family, NF-IL6 beta, forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6. *PNAS* 89: 1473-1476

- Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Kohler G (1994):** Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368: 339-342
- Koj A (1996):** Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *BBA* 1317: 84-94
- Kojima H, Nakajima K, Hirano T (1996):** IL-6-inducible complexes on an IL-6 response element of the junB promoter contain STAT3 and 36 kDa CRE-like site binding protein(s). *Oncogene* 12: 547-554
- Krauss G (1997):** *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*. Weinheim. Wiley-VCH
- Krogh-Rasmussen A, Kayser L, Bech K, Feldt-Rasmussen U, Perrild H, Bendtzen K (1991):** *Acta Endocrinol Copenh* 124: 577-582
- Kusui T, Benya RV, Battey JF, Jensen RT (1994):** Glycosylation of bombesin receptors: characterization, effect on binding, and G-protein coupling. *Biochem* 33: 12968-12980
- Landschulz WH, Johnson PE, Adashi EY, Graves BJ, McKnight SL (1988):** Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes Dev* 2: 786-800
- Landschulz WH, Johnson PE, McKnight SL (1988):** The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240: 1759-1764
- Landschulz WH, Johnson PE, McKnight SL (1989):** The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science* 243: 1681-1688
- Lee J, Pilch PF (1994):** The insulin receptor: structure, function and signalling. *Am J Physiol* 266: C319-C334
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtke H (1977):** RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 18: 4743-4751
- Lemaigre FP, Rousseau GG (1994):** Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. *Biochem J* 303: 1-14
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtke H (1977):** RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16: 4743-4751
- Liu J, Park EA, Gurney AL, Roesler WJ, Hanson RW (1991):** Cyclic AMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription is mediated by multiple promoter elements. *JBC* 266: 19095-19102
- Liu S, Croninger C, Arizmendi C, Harade-Shiba M, Ren J, Poli V, Hanson RW, Friedmann JE (1999):** Hypoglycemia and impaired hepatic glucose production in mice with a deletion of the C/EBP β gene. *J Clin Invest* 103: 207-213

- Loose DS, Cameron DK, Short HP, Hanson RW (1985):** Thyroid hormone regulates transcription of the gene for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in rat liver. *Biochem* 24: 4509-4512
- Lütticken C, Coffey P, Yuan J, Schwartz C, Caldenhoven E, Schindler C, Kruijer W, Heinrich PC, Horn F (1995):** Interleukin-6-induced serine phosphorylation of transcription factor APRF: evidence for a role in interleukin-6 target gene induction. *FEBS Lett* 360: 137-143
- Mandel M, Higa A (1970):** Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53: 159-162
- Mathi SK, Chan Y, Li X, Wheeler MB (1997):** Scanning of the glucagon-like peptide-1 receptor localizes g protein-activating determinants primarily to the N terminus of the third intracellular loop. *Mol Endocrinol* 11: 424-432
- McCallum (1982):** Hepatocyte-Kupffer cell interactions in the inhibition of hepatic gluconeogenesis by bacterial endotoxin. Pathophysiological effects of endotoxins at the cellular level. New York. Alan R Liss. 99-113
- McCubrey JA, May WS, Duronio V, Mufson A (2000):** Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia* 14: 9-21
- McDonald TP, Dinnis DM, Morrison CF, Harmar AJ (1998):** Desensitization of the human vasoactive intestinal peptide receptor (hVIP2/PACAP R): evidence for agonist-induced receptor phosphorylation and internalization. *Ann NY Acad Sci* 865: 64-72
- Metzger S, Begleiter N, Barash V, Drize O, Peretz T, Shiloni E, Chajek-Shaul T (1997):** Tumor necrosis factor inhibits the transcriptional rate of glucose-6-phosphatase in vivo and in vitro. *Metabolism* 46: 579-583
- Metzger S, Goldschmidt N, Barash V, Peretz T, Drize O, Shilyansky J, Shiloni E, Chajek-Shaul T (1997):** Interleukin-6 secretion in mice associated with reduced glucose-6-phosphatase and liver glycogen levels. *Am J Physiol* 273: 262-267
- Michalopoulos GK, DeFrances MC (1997):** Liver regeneration. *Science* 276: 60-66
- Mischoulon D, Rana B, Bucher NL, Farmer SR (1992):** Growth-dependent inhibition of CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP alpha) gene expression during hepatocyte proliferation in the regenerating liver and in culture. *MCB* 12: 2553-2560
- Mizock BA (1995):** Alterations in carbohydrate metabolism during stress: a review of the literature. *Am J Med* 98: 75-84
- Montminy M (1997):** Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 66: 807-822

- Nakajima K, Kusafuka T, Takeda T, Fujitani Y, Naakae K, Hirano T (1993):** Identification of a novel interleukin-6 response element containing an ets-binding site and a CRE-like site in the junB promotor. *MCB* 13 (5): 3027-3041
- Neuschäfer-Rube F, Püschel G, Jungermann K (1993):** Characterization of prostaglandin-F2 alpha-binding sites on rat hepatocyte plasma membranes. *Eur J Biochem* 211: 163-169
- Ng SB, Tan YH, Guy GR (1994):** Differential induction of the interleukin-6 gene by tumor necrosis factor and interleukin-1. *JBC* 269: 19021-19027
- Nizielski SE, Arizmendi C, Shteyngarts AR, Farrell CJ, Friedmann JE (1996):** Involvement of transkriptionfaktor C/EBP β in stimulation of PEPCK gene expression during exercise. *Am J Physiol* 270: R1005-R1012
- Park EA, Roesler WJ, Liu J, Klemm DJ, Gurney AL, Thatcher JD, Shuman J, Friedmann A, Hanson W (1990):** The role of the CCAAT/enhancer-binding protein in the transcriptional regulation of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). *Mol Cell Biol* 10: 6264-6272
- Park EA, Gurney AL, Nizielski SE, Hakimi P, Cao Z, Moorman A, Hanson W (1992):** Relativ roles of CCAAT/enhancer-binding protein and cAMP regulatory element-binding protein in controlling transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). *JBC* 269: 613-619
- Park EA, Jerden DC, Bahouth SW (1995):** Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by thyroid hormone involves two distinct binding sites in the promoter. *Biochem J* 309: 913-919
- Park EA, Song S, Olive M, Roesler WJ (1997):** CCAAT-enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) is required for the thyroid hormone but not the retinoic acid induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene transcription. *Biochem J* 322: 343-349
- Patel YM, Yun JS, Liu J, McGrane MM, Hanson W (1994):** An analysis of regulatory elements in the PEPCK gene which are responsible for its tissue-specific expression and metabolic control in transgenic mice. *JBC* 268: 5619-5628
- Pilkis SJ, Granner DK (1992):** Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 54: 885-909
- Pitcher JA, Friedmann A, Lefkowitz RJ (1998):** G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67: 653-692
- Pohl SL (1976):** Methods in receptor research. New York. Marcel Dekker. 159-174
- Püschel GP, Kirchner C, Schroder A, Jungermann K (1993):** Glycogenolytic and antiglycogenolytic prostaglandin E2 actions in rat hepatocytes are mediated via different signalling pathways. *Eur J Biochem* 218: 1083-1089

- Püschel GP, Christ B (1994):** Inhibition by PGE₂ of glucagon-induced increase in phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA and acceleration of mRNA degradation in cultered rat hepatocytes. FEBS Lett 351: 353-356
- Qui Y, Robinson D, Pretlow TG, Kung HJ (1998):** Etk/Bmx, a tyrosine kinase with a pleckstrin-homology domain, is an effector of phosphatidylinositol 3'-kinase and is involved in interleukin 6-induced neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. PNAS 95: 3644-3649
- Ramadori G, Christ B (1999):** Cytokines and the hepatic acute phase response. Seminars in liver disease 19: 141-155
- Roesler WJ, Vandenbark GR, Hanson RW (1989):** Identification of multiple protein binding domains in the promotor-regulatory region of the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene. JBC 264: 9657-9664
- Roesler WJ, Graham JG, Kolen R, Klemm DJ, McFie PJ (1995):** The cAMP response element binding protein synergizes with other transcription factors to mediate cAMP responsiveness. JBC 270: 8225-8232
- Roesler WJ, Crosson SM, Vinson C, McFie PJ (1996):** The alpha-isoform of the CCAAT/enhancer-binding protein is required for mediating cAMP responsiveness of the phosphoenolpyruvate carboxykinase promoter in hepatoma cells. JBC 271: 8068-8074
- Roesler WJ, Park EA, McFie PJ (1998):** Characterization of CCAAT/enhancer-binding protein alpha as a cyclic AMP-responsive nuclear regulator. JBC 273: 14950-14957
- Sakmar TP (1998):** Rhodopsin: a prototypical G protein-coupled receptor. Mol Biol 59: 1-34
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989):** Molecular cloning: a laboratory manual. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Seidel HM, Milocco LH, Lamb P, Darnell Jr JE, Stein RB, Rosen J (1995):** Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity. PNAS 92: 3041-3045
- Schindler U, Wu P, Rothe M, Bresseur M, McKnight SL (1995):** Components of a Stat recognition code: evidence for two layers of molecular selectivity. Immunity 2: 689-697
- Schumann G, Huell M, Machein U, Hocke G, Fiebich BL (1999):** Interleukin-6 activates signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways and induces de novo protein synthesis in human neuronal cells. J Neurochem 73: 2009-2017

- Shigekawa K, Dower WJ (1988):** Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into the cells. *Biotechniques* 6: 742-751
- Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell Jr JE (1994):** Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76: 821-828
- Stahl N, Farrugella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell Jr JE, Yancopoulos GD (1995):** Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267: 1349-1353
- Stouthard JM, Romijn JA, van der Poll T, Endert E, Klein S, Bakker PJ, Veenhof CH, Sauerwein HP (1995):** Endocrinologic and metabolic effects of interleukin-6 in humans. *Am J Physiol* 268: E813-E819
- Stith RD, Luo J (1994):** Endocrine and carbohydrateresponse to interleukin-6 *in vivo*. *Circ Shock* 44: 210-215
- Stümpel F, Scholtka B, Hunger A, Jungermann K (1998):** Enteric glucagon-37 rather than pancreatic glucagon-29 stimulates glucose absorption in rat intestine. *Gastroenterology* 115: 1163-1171
- Strassmann G, Fong TM, Windsor S, Neta R (1993):** The role of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced weight loss, hypoglycemia and fibrinogen production, *in vivo*. *Cytokine* 5: 285-290
- Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D (1994):** Structure and function of G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 63: 101-132
- Strader CD, Fong TM, Graziano MP, Tota MR (1995):** The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J* 9: 745-754
- Takhar S, Gyomory S, Su RC, Mathi SK, Li X, Wheeler MB (1996):** The third cytoplasmic domain of the GLP-1 receptor is required for coupling to the adenylyl cyclase system. *Endo* 137: 2175-2178
- Titheradge MA, Knowels RG, Smith FS, Horton RA, Ceppi ED (1995):** Mechanism of inhibition of hepatic gluconeogenesis by bacterial endotoxin: a role for nitric oxide. *Biochem Soc Transact* 23: 1002-1008
- Tsigos C, Papanicolaou DA, Kyrou I, Defensor R, Mitsiadis CS, Chrousos GP (1997):** Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 in humans. *J Clin Physiol* 82: 4167-4170
- Tsukada J, Saito K, Waterman WR, Webb AC, Auron PE (1994):** Transcription factors NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 β gene. *Mol Cell Biol* 14: 7285-7297

- Ulken V, Püschel GP, Jungermann K (1991):** Increase in glucose and lactate output and perfusion resistance by stimulation of hepatic nerves in isolated perfused rat liver: role of α_1 -, α_2 -, β_1 - and β_2 -receptors. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 372: 401-409
- Unson CG, Cypess AM, Kim NH, Goldsmith PK, Carruthers CJL, Merrifield RB, Sakmar TP (1995):** Characterization of deletion and truncation mutants of the rat glucagon receptor. *JBC* 270: 27720-27727
- Unson CG, Cypess AM, Wu CR, Goldsmith PK, Merrifield RB, Sakmar TP (1996):** Antibodies against specific extracellular epitopes of the glucagon receptor block glucagon binding. *Proc Natl Acad Sci* 93: 310-315
- Wolfe RR, Burke JF (1978):** Glucose and lactate metabolism in experimental septic shock. *Am J Physiol* 235: 219-227
- Wang K, Deutschmann CS, Clemens MG, De Maio A (1995):** Reciprocal expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase and acute phase genes during acute inflammation. *Shock* 3: 204-209
- Wang N, Finegold MJ, Bradley A, Ching NO, Aabdelsayed SV, Wilde MD, Taylor RL, Wilson DR, Darlington GJ (1995):** Rimpaired energy homeostasis in C/EBP α knockout mice. *Science* 269: 1108-1112
- Wegenka UM, Buschmann J, Luticken C, Heinrich PC, Horn F (1993):** Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol* 13: 276-288
- Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr (1995):** Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82: 241-250
- Wess J (1997):** G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB* 11: 346-354
- Widmann C, Dolci W, Thorens B (1996):** Heterologous desensitization of the glucagon-like peptide-1 receptor by phorbol esters requires phosphorylation of the cytoplasmic tail at four different sites. *JBC* 271 (33): 19957-19963
- Widmann C, Dolci W, Thorens B (1997):** Internalization and homologous desensitization of the GLP-1 receptor depend of the receptor carboxyl tail at the same three sites. *Mol Endocrin* 11 (8): 1094-1102
- Yelich MR, Witek-Janusek L, Filkins JP (1986):** Glucose dyshomeostasis in endotoxiosis: direct versus monokine-mediated mechanism of endotoxin action. *Immunobiology and immunopharmacology of bacterial endotoxins*. New York. Plenum Press. 111-132
- Zhang X, Blenis J, Li HC, Schindler C, Chen-Kiang S (1995):** Requirement of serine phosphorylation for formation of Stat-promotor complexes. *Science* 267: 1990-1994