

Der Einfluss zellautonomer gp130 Aktivierung bei der Leber- und Darmentzündung und Tumorbildung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Monja Gandraß

Kiel, 2023

Erster Gutachter: Prof. Dr. Stefan Rose-John
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder
Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2023
gez. Prof. Dr. Frank Kempken, Dekan

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass die nachfolgende Abhandlung eigenständig und unter Einhaltung der Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft verfasst wurde. Nur die angegebenen Quellen und Hilfen wurden verwendet. Zitate, wörtlich oder sinngemäß, wurden als solche gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde weder ganz noch zum Teil im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt und ist weder veröffentlicht noch zur Veröffentlichung eingereicht worden.

Ich versichere, dass ich bis zum heutigen Tag weder an dieser, noch an einer anderen Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe oder mir ein akademischer Titel aberkannt wurde.

Kiel, 2023

Monja Gandraß

Zusammenfassung

Mitglieder der IL-6 Zytokinamilie signalisieren über die signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit gp130, wobei insbesondere IL-6 an Entzündungs- und Regenerationsprozessen sowie der Tumorentstehung in der Leber und dem Darm beteiligt ist. Hierbei ist es jedoch schwierig, einem einzelnen Zelltypen einen biologischen Beitrag zuzuordnen.

Um die Auswirkungen einzelner Zelltypen bei der Leber- und Darmentzündung sowie der Tumorbildung zu analysieren, generierten wir Mäuse mit einer Cre-induzierbaren Expressionskassette, welche für ein konstitutiv aktives gp130 kodiert ($R26^{Lgp130}$). Diese Mäuse kreuzten wir mit Cre-Treibern für Hepatozyten (Alb-CreERT²) und intestinale Epithelzellen (Vil-CreERT²).

Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse zeigen eine zellautonome gp130 Aktivierung in Hepatozyten und eine Induktion der Akut-Phase-Reaktion. Das hepatische myeloide Kompartiment ist in Mäusen mit Lgp130-Expression in Hepatozyten verändert. Trotz langanhaltender Aktivierung von gp130 findet keine Induktion von Lebertumoren bei gealterten Mäusen mit Lgp130 Aktivierung in Hepatozyten statt. Als Folge der anhaltenden Hochregulierung von Akut-Phase-Proteinen leiden gealterte Mäuse mit Hepatozyten-spezifischem gp130-Signalweg an Amyloidose. Die konstitutive gp130 Aktivierung in Hepatozyten hat keinen Einfluss auf die Morphologie des Darms. Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse zeigen bei einer DSS-Kolitis eine geringere Epithelschädigung trotz vermehrtem Gewichtsverlust. Mäuse mit Lgp130-Expression in Hepatozyten zeigen eine vermehrte Tumorbildung nach einer AOM/DSS-Kolitis.

Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse mit Lgp130 Expression in intestinalen Epithelzellen weisen nach zellautonomer gp130 Aktivierung eine leicht veränderte Darmmorphologie auf. Bei einer DSS-Kolitis zeigen Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse einen geringeren Schweregrad der epithelialen Schädigungen trotz vermehrtem Gewichtsverlust. Die konstitutive gp130 Aktivierung in intestinalen Epithelzellen führt nach einer AOM/DSS-Kolitis zur vermehrten Tumorbildung.

Zusammenfassend weisen unsere Ergebnisse auf eine zentrale Rolle von gp130 bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems und der Akut-Phase-Reaktion hin und zeigen eine pro-tumorigene Rolle bei Kolitis-assoziiertem Darmkrebs.

Abstract

Members of the IL-6 type cytokine family signal via the signal transducing receptor subunit gp130. In particular IL-6 is involved in inflammation, regeneration and tumorigenesis in the liver and intestine. However, it is difficult to delineate the biological contribution of a single cell type.

To analyze the effects of single cell types in liver and intestinal inflammation and tumor formation, we generated mice with a Cre-inducible expression cassette encoding a constitutively active gp130 ($R26^{Lgp130}$). We breed these mice with Cre-drivers for hepatocytes (Alb-CreERT²) and intestinal epithelial cells (Vil-CreERT²).

Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} mice show cell-autonomous gp130 activation in hepatocytes and induction of the acute phase response. The hepatic myeloid compartment is altered in mice with gp130 signalling in hepatocytes. Despite prolonged activation of gp130, there is no induction of liver tumors in aged mice with Lgp130 activation in hepatocytes. Resulting from persistent up-regulation of acute-phase-proteins, aged mice with hepatocytic gp130 signaling suffer from amyloidosis. Constitutive gp130 activation in hepatocytes does not affect gut morphology. Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} mice show reduced severity of epithelial damage in DSS colitis despite increased weight loss. Mice expressing Lgp130 in hepatocytes show increased tumor formation after AOM/DSS colitis.

Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} mice with Lgp130 expression in intestinal epithelial cells exhibit slightly altered intestinal morphology after cell-autonomous gp130 activation. In DSS colitis, Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} mice show a lower severity of epithelial damage despite increased weight loss. Constitutive gp130 activation in intestinal epithelial cells leads to increased tumor formation after AOM/DSS colitis.

In conclusion, our results point out the central role of gp130 in activation of the innate immune system and acute-phase response and identify a pro-tumorigenic role in colitis-associated colorectal cancer.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Interleukin 6 Zytokinfamilie	1
1.2	Glycoprotein gp130	5
1.3	IL-6 Signaltransduktion	6
1.4	Lgp130	8
1.5	Die Leber	10
1.5.1	Zelluläre Struktur und Funktion	10
1.5.2	Akut-Phase-Reaktion	13
1.6	Der Gastrointestinaltrakt	15
1.6.1	Aufbau	15
1.6.2	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	19
1.6.3	Darmkrebs	20
2	Fragestellung	23
3	Material & Methoden	24
3.1	Material	24
3.1.1	Chemikalien	24
3.1.2	Primer	24
3.1.3	Antikörper	25
3.1.4	Mauslinien	27
3.2	Methoden	27
3.2.1	Tierversuche	27
3.2.1.1	Haltung	27
3.2.1.2	Zucht	27
3.2.1.3	Genotypisierung	27
3.2.1.4	DSS-Kolitis Mausmodell	31
3.2.1.5	AOM/DSS-Kolitis Mausmodell	31
3.2.1.6	Organ- und Blutentnahme	32
3.2.1.7	Histologie	32
3.2.1.8	Immunhistochemie	33
3.2.1.9	Histologische Färbungen	34

3.2.1.10	Gewebe-Kryokonservierung	35
3.2.1.11	Immunfluoreszenz	36
3.2.1.12	Immunfluoreszenz nach TSA	36
3.2.1.13	RNA Isolation	37
3.2.1.14	cDNA Synthese	39
3.2.1.15	Quantitative Real-Time PCR	39
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden	39
3.2.2.1	Proteinlysate	39
3.2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	40
3.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
3.2.2.4	Immuno-Blotting	42
3.2.2.5	Strippen des Immuno-Blots	43
3.2.2.6	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	43
3.2.2.7	Multiplex-Assay	44
3.2.3	Statistik	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Zellautonome gp130 Aktivierung in Hepatozyten im Mausmodell	45
4.2	Hepatozyten-spezifische gp130/STAT3 Aktivierung ist ausreichend zur Induktion der Akut-Phase-Reaktion	47
4.3	Rekrutierung von myeloiden Zellen durch Hepatozyten-spezifische gp130 Aktivierung	51
4.4	Systemische Amyloidose als Folge anhaltender Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung	53
4.5	Keine morphologische Veränderung im Colon durch Lgp130 Aktivierung in Hepatozyten	55
4.6	Lgp130 Aktivierung in Hepatozyten führt zu geringerem Schweregrad bei einer DSS-Kolitis	57
4.7	Vermehrte Tumorinduktion nach einer AOM/DSS-Kolitis durch Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung	61
4.8	Lgp130 Aktivierung in intestinalen Epithelzellen führt zu leicht veränderter Darmmorphologie	65
4.9	Lgp130 Aktivierung in intestinalen Epithelzellen führt zu geringerem Schweregrad einer bei einer DSS-Kolitis	67

4.10 Vermehrte Tumorinduktion nach einer AOM/DSS-Kolitis bei Lgp130 Aktivierung in intestinalen Epithelzellen	69
5 Diskussion	73
5.1 Konstitutiv aktive gp130 Aktivierung in Hepatozyten als Modell für sterile Infektion und systemische Entzündungen	73
5.2 Konstitutiv aktive gp130 Aktivierung in intestinalen Epithelzellen als Modell für lokale SAA Erhöhung im Darm	83
5.3 Konstitutiv aktive gp130 Aktivierung in Hepatozyten und intestinalen Epithelzellen hat eine schützende Wirkung auf das Darmepithel bei einer DSS-Kolitis	85
5.4 Pro-tumorigene Rolle von konstitutiv aktivem gp130 in Hepatozyten und intestinalen Epithelzellen bei Kolitis-assoziiertem Darmkrebs	91
6 Literaturverzeichnis	96
7 Appendix	128
7.1 Abkürzungsverzeichnis	128
7.2 Abbildungsverzeichnis	135
7.3 Tabellenverzeichnis	137
7.4 Curriculum Vita	138
7.5 Danksagung	140

1 Einleitung

1.1 Interleukin 6 Zytokinfamilie

Zytokine sind interzelluläre Mediatoren und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Apoptose, Differenzierung und Proliferation von Zellen [1].

Die Interleukin-6 Zytokinfamilie umfasst Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 11 (IL-11), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *leukemia inhibitory factor* (LIF), *oncostatin M* (OSM), *cardiotrophin-1* (CT-1), *cardiotrophin-like cytokine* (CLC) und Interleukin 27 (IL-27) [2]. Hierbei ist die Verwendung von mindestens einem Molekül der signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit Glykoprotein 130 (gp130) in jeweiligen Signalkomplex charakteristisch für die Zytokinfamilie (Abb. 1.1) [3, 4].

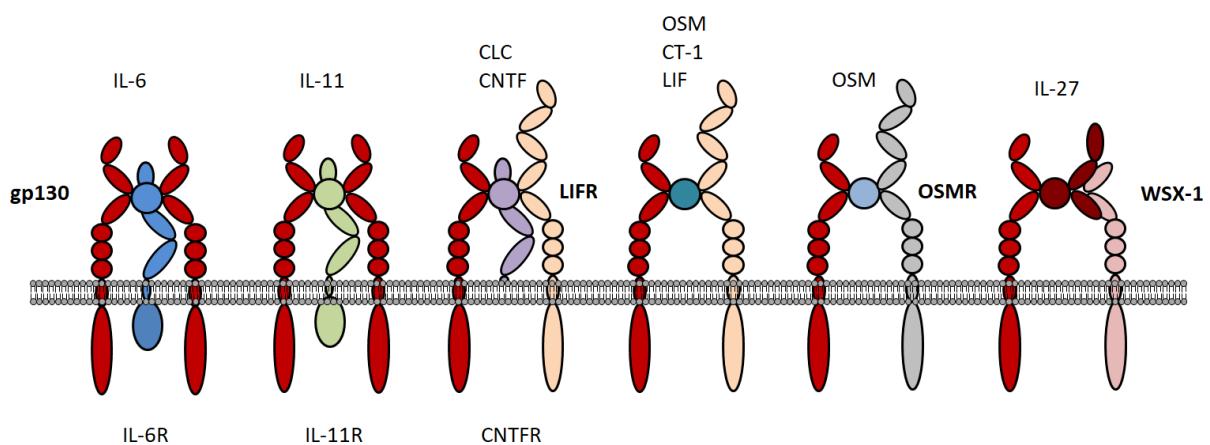


Abb. 1.1: Rezeptorkomplexbildung der Interleukin 6 Zytokinfamilie. Alle Mitglieder der IL-6 Zytokinfamilie rekrutieren die Rezeptoruntereinheit gp130. Hierbei wird entweder eine Homodimerisierung zweier gp130-Moleküle oder eine Heterodimerisierung von gp130 mit dem LIFR, OSMR oder WSX-1 induziert. IL-6: Interleukin-6, IL-11: Interleukin-11, LIF: *leukaemia inhibitory factor*, CT-1: *cardiotrophin-1*, CNTF: *ciliary neutrophic factor*, OSM: *oncostatin M*, CLC: *cardiotrophin-like cytokine*, LIFR: *leukaemia inhibitory factor receptor*.

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, welches sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften aufweist. Es ist ein glykosyliertes Protein [3], besteht aus 184 Aminosäuren [5] und hat eine Masse von 26 kDa [6]. IL-6 ist ein Zytokin mit einem vier Helixbündel, dessen Orientierung einer typischen Up-Up-Down-Down Topologie folgt [7].

Historisch wurde das Zytokin IL-6 aufgrund seiner Bedeutung für die B-Zell Differenzierung und Proliferation, sowie für die Immunglobulin (Ig-) Produktion durch Plasmazellen ursprünglich als Differenzierungsfaktor für B Zellen (*B-cell stimulating factor*, BSF) beschrieben [8-10]. IL-6 stimuliert die Hämatopoiese [11], zum Beispiel die Differenzierung

zu Makrophagen [12] und Megakaryozyten [13]. Ebenso ist IL-6 ein unabhängiger Regulator der Granulopoese [14]. Auch bei der Regulation des Metabolismus wird IL-6 eine wichtige Rolle zugeschrieben [15, 16]. So stimuliert IL-6 die Glukoseverwertung, die Lipolyse und den oxidativen Stoffwechsel [17, 18].

IL-6 reguliert die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von T Zellen [19]. T-Zellen werden in naive CD4⁺ T-Helfer-Zellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen unterschieden. CD4⁺ T-Helferzellen unterteilen sich weiter in T_H1- und T_H2-Zellen, T_H17-Zellen und in die regulatorischen T-Zellen. Für die T_H1-Zellen ist eine hohe Interferon (IFN)- γ , *Tumor necrosis factor* (TNF) α und IL-2 Produktion charakteristisch, wohingegen T_H2-Zellen IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 induzieren [20]. IL-6 hat eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von T_H17-Zellen. So induziert IL-6 zusammen mit dem transformierenden Wachstumsfaktor (TGF) β durch Aktivierung von *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 3 die Expression des Transkriptionsfaktors *RAR-related orphan receptor gamma* (ROR γ t), der die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in IL-17 sekretierende T_H17-Zellen induziert [21-23]. In Abwesenheit von TGF β induziert eine Kombination von IL-6 mit IL-1 β und IL-23 einen pathogenen T_H17-Phänotyp [24, 25]. Darüber hinaus induziert Serum Amyloid A (SAA) Proteine in Kombination mit IL-6 ebenfalls einen pathogenen T_H17-Phänotyp unabhängig vom TGF β [26].

Das Zytokin IL-6 wird als Reaktion auf akute Infektionen, Gewebsschädigung und in Autoimmun- und Tumorerkrankungen exprimiert. Hierbei kann der IL-6 Serumspiegel in Extremfällen von einem basalen Spiegel von 1-5 pg/ml bis zu mehreren μ g/ml ansteigen [27, 28]. Während der Akutphase induziert IL-6 die Expression der Akut-Phase-Proteine in Hepatozyten (s. Abschnitt 1.5.2) [29, 30]. IL-6 ist an der Pathogenese inflammatorischer Krankheiten beteiligt, wie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis [27, 31], juvenilen Arthritis [32], Morbus Castleman [33] und chronisch entzündliche Darmerkrankungen (*inflammatory bowel disease* IBD) [34]. Darüber hinaus kann eine unausgeglichene IL-6 Signalgebung entzündungs-getriebene Karzinogenese fördern [35], was zu Leberkrebs [36, 37], Bauchspeicheldrüsenkrebs [38] und Darmkrebs [39-41] führt.

IL-6-defiziente Mäuse sind lebensfähig und weisen keine makroskopischen Anomalien auf. Jedoch zeigen diese Tiere eine beeinträchtigte Akut-Phase-Reaktion, eine verminderte T - und B - Zellreaktion sowie eine gestörte Immunglobulinproduktion nach Virusinfektionen. Zusätzlich zeigen IL-6-defiziente Mäuse einen Mangel an neutrophiler Proliferation, was zu einer fehlenden Beseitigung der Listerien bei einer Infektion führt [42, 43].

IL-6 fördert in der Leber die Geweberegeneration nach Verletzungen. IL-6 Knockout Mäuse zeigten eine beeinträchtigte Leberregeneration nach einer Hepatektomie, was sich in Lebernekrose und –versagen äußerte [44, 45]. Dabei wiesen IL-6 Knockout Mäuse Anomalien in der G1-Phase des Zellzyklus auf, was zu einer verminderte Expression von mit dem Zellzyklus assoziierten Genen und Transkriptionsfaktoren wie Aktivator-Protein-1 (AP-1), c-Myc und Cyclin D1 führte. Des Weiteren war die DNA-Synthese in Hepatozyten dieser Mäuse abgeschwächt [44]. Darüber hinaus konnten hohe IL-6 Serumspiegel in Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen wie akute und virale Hepatitis [46], alkoholische Leberzirrhose [47] und primäre biläre Leberzirrhose [48] assoziiert werden. Gleichzeitig kann eine deregulierte IL-6 Signalübertragung zu unkontrollierter Proliferation und hepatzellulären Adenomen führen [49-51], was ebenso in doppelt transgenen IL-6/sIL-6 Mäusen bei anhaltender Aktivierung des IL-6 Trans-Signalings gezeigt werden konnte [52]. Die IL-6 Trans-Signalübertragung ermöglicht durch proteolytische Abspaltung des membranständigen IL-6R α die Bildung eines Komplexes aus einer löslichen Form des IL-6R und IL-6. Dieser Komplex kann wiederum an gp130 auf Zellen binden, die den IL-6R nicht exprimieren (s. Abschnitt 1.3) [28]. Auch aktivierende gp130-Mutanten in Menschen konnten bereits mit gutartigen Leberzirrhosen in Verbindung gebracht werden [50].

IL-6 ist ein Schlüsselzytokin, welches bei Darmentzündungen sowohl proinflammatorische, als auch regenerationsfördernde Eigenschaften aufweist [53, 54]. So wurde ein erhöhter IL-6 Serumspiegel bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (*inflammatory bowel disease* IBD) in den intestinalen Schleimhäuten gefunden [55, 56], jedoch ist eine Korrelation von IL-6 Serumspiegel und Krankheitsschwere ambivalent [55, 57]. IL-6 trägt zu einem verstärkten Überleben von T-Zellen und Apoptoseresistenz in der Lamina propria an entzündeten Stellen bei IBD bei [34, 58]. STAT3 wird eine wesentliche Rolle bei der Epithelproliferation und –regeneration zugeschrieben [59, 60]. Mit Hilfe der Dextran-Sodium-Sulfat (DSS)-Kolitis können chronisch entzündliche Darmerkrankungen im Mausmodell untersucht werden. Zur Induktion einer Dünnt- und Dickdarmentzündung wird den Mäusen DSS über das Trinkwasser verabreicht, welches die natürliche Integrität des Darmepithels zerstört. Wildtyp-Mäuse zeigten in der DSS-induzierten Kolitis eine deutlich stärkere Krankheitsaktivität und Darmentzündung [61] bei deutlich erhöhtem IL-6 Serumspiegel und gesteigerter Granulozyteninfiltration [62].

Studien zeigten bereits eine funktionale Rolle der IL-6 Trans-Signalübertragung bei DSS-behandelten Mäusen und IBD-Patienten. Morbus Crohn Patienten mit chronischen

Darmerkrankungen wiesen eine erhöhte Resistenz mukosaler T-Zellen gegen Apoptose auf. Diese T-Zellen produzieren IL-6, besitzen selber jedoch keinen membrangebundenen IL-6R. Daher sind sie auf die IL-6 Trans-Signalübertragung und die Freisetzung von IL-6R angewiesen, welcher höchstwahrscheinlich von Makrophagen und infiltrierenden Neutrophilen freigesetzt wird. Olamkicept (sgp130Fc) ist ein therapeutischer Ansatz für chronisch entzündliche Darmerkrankungen, das die IL-6-Trans-Signalübertragung blockiert. Das Classic Signaling über den membranständigen IL-6R α wird jedoch nicht beeinflusst (s. Abschnitt 1.3). Hierbei wird der IL-6/sIL-6R-Komplex kompetitiv gehemmt, wobei Olamkicept weder mit IL-6 noch mit IL-6R interagiert [63]. Das Fusionsprotein besteht aus zwei vollständigen extrazellulären Domänen von gp130, die durch Fusion mit der kristallisierbaren Fragmentregion (Fc-Region) vom menschlichen Immunglobulin (Ig) G1 dimerisiert wurden. Eine spezifische Neutralisierung von sIL-6R *in vivo* durch sgp130Fc führte zur Induktion der Apoptose. Dies deutet darauf hin, dass sIL-6R die Apoptose in den Schleimhäuten verhindert [34, 64].

Olamkicept konnte bereits im DSS-Kolitis Mausmodell die Kolitisaktivität unterdrücken und Apoptose von T-Zellen induzieren [34]. Auch Phase-2a-Studien an Patienten konnten zeigen, dass die Trans-Signal-Hemmung durch Olamkicept vom Mausmodell auf den Patienten übertragen werden kann. So konnte eine klinische Wirksamkeit anhand vollständiger Remission in Form eines vollständigen und schnellen Rückgangs der klinischen Symptome, der Entzündungsmarker und der endoskopischen Aktivität bei 19 % der Patienten (3/16), sowie klinisch signifikantes Ansprechen bei 44 % der Patienten (7/16) aufgezeigt werden. Darüber hinaus zeigte sich eine klinische Wirksamkeit anhand Transkriptionsveränderungen in der entzündeten Schleimhaut, eine Herunterregulierung der Gene für die neutrophile Degranulation und einen Rückgang der Phosphorylierung von STAT3 aufgezeigt werden. Die weitere Wirksamkeit wird derzeit in multizentrischen, randomisierten, prospektiven, placebokontrollierten Phase-2-Studie bei Patienten mit mittelschwerer bis schwerer aktiver Colitis ulcerosa untersucht (NCT03235752) [65].

1.2 Glykoprotein gp130 kDa

Glykoprotein 130 kDa (gp130) ist ein transmembranes Typ I Protein, welches zur Typ-1-Zytokinrezeptoren-Gruppe gehört und ubiquitär exprimiert wird [66].

Die extrazelluläre Domäne von gp130 besteht aus einer Immunglobulin-ähnlichen Domäne D1, gefolgt von einem Zytokin Bindungsmodul (*cytokine binding module* CBM), die die Domänen D2 und D3 enthält. Diese zwei Domänen beinhalten vier konservierte Cysteinreste und das WSXWS Motiv (Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin) (Trp-Ser-Glu-Trp-Ser) [66, 67]. In der membranproximalen Region befinden sich die Fibronectin-Typ-3 Domänen (D4, D5 und D6), gefolgt von der Transmembran (TM) und der intrazellulären Domäne (ICD), welche mit einer Janus Kinase (JAK) assoziiert ist [68-70]. Die extrazelluläre Domäne D1, sowie die Domänen D2 und D3 des Zytokin Bindungsmoduls sind an der Bindung von IL-6 beteiligt. Die Fibronectin-Typ-3 Domänen D4 bis D6 sind dagegen an der Signalübertragung zum zytoplasmatischen Teil beteiligt (Abb. 1.2) [71, 72].

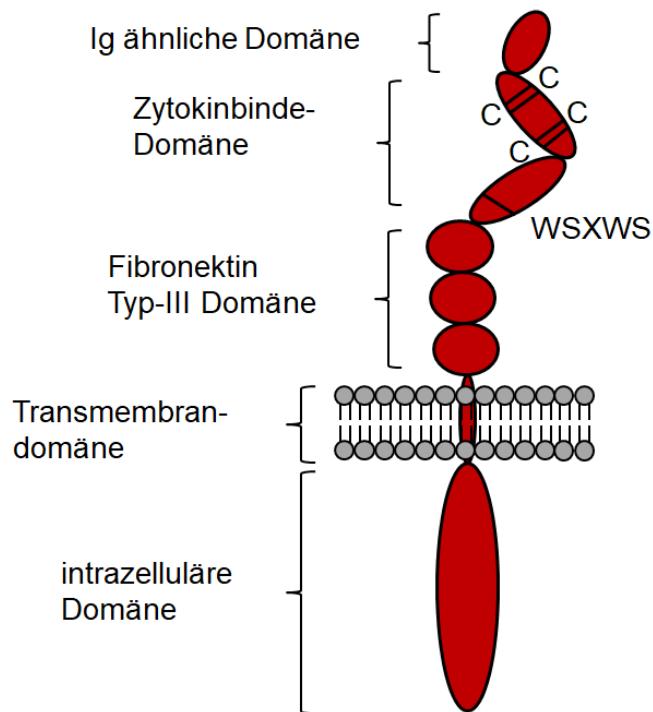


Abb. 1.2: Struktureller Aufbau von gp130. Die extrazelluläre Domäne von gp130 besteht aus einer Immunglobulin (Ig) ähnlichen Domäne, einem Zytokinbindemodul und drei Fibronectin Typ-III Domänen, gefolgt von der Transmembrandomäne und der Intrazellulären Domäne, welche mit Janus-Kinasen assoziiert ist.

1.3 IL-6 Signaltransduktion

Zur Initiierung der Signalübertragung wird IL-6 vom IL-6 Rezeptor α (IL-6R α) rekrutiert. Dieser besitzt selber keine Möglichkeit zur intrazellulären Signalweitergabe. Dieser niedrigaffine Komplex bindet im Anschluss an ein Homodimer von transmembranen gp130, was zu einem hochaffinen Hexamer und signalübertragenden Komplex führt [66, 73, 74]. Die IL-6 induzierte Signaltransduktion wird durch die Bildung des Rezeptorkomplexes ausgelöst. Durch die Bindung von gp130 an konstitutiv mit gp130 assoziierten Kinasen (Januskinase 1 (JAK1) und Tyrosinkinase 2 (Tyk2)) wird gp130 an Tyrosinresten phosphoryliert. Die phosphorylierten Tyrosinreste dienen nachfolgend als Bindestelle für Proteine mit *Src-homology 2* Domänen (SH2) [75], welche einen Ausgangspunkt für Faktoren der Signaltransduktionkaskade wie z.B. STAT bilden. Sie assoziieren mit den Rezeptoren und werden phosphoryliert.

Nachfolgend dissoziieren STATs vom Rezeptor und homodimerisieren oder heterodimerisieren mit einem weiteren phosphorylierten STAT. Im Anschluss translozieren sie in den Kern, wo sie an die DNA binden und als Transkriptionsfaktor wirken [76]. Stromabwärts von gp130 wird hauptsächlich STAT3 aktiviert [77], wobei an gp130 Homodimere ebenfalls STAT1 und STAT3 rekrutiert werden [78, 79]. Das Homodimer aus STAT3-STAT3 induziert die Genexpression STAT3-responsiver Gene [76, 77].

SH2-haltige Protein-Tyrosin-Phosphatase (SHP2), welches aufgrund der SH2-Domäne eine hohe Affinität zu phosphorylierten Tyrosinresten aufweist, und *Growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) dienen als Adaptorproteine und binden *son of sevenless* (SOS), ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor. Dieser aktiviert das membrangebundene kleine G-Protein Ras und initiiert die Ras-Raf- Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPKinase)-Kaskade. Die Ras-Raf-MAPK-Kaskade führt zur Aktivierung der Serin- und Threonin-Kinasen *Extracellular signal-regulated kinases* (Erk) 1/2, welche aktivierend auf Transkriptionsfaktoren wirken [80, 81]. Die IL-6 Signalkaskade führt darüber hinaus zur Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) / AKT-Modul [82], das direkt oder durch ein aktives Ras induziert wird [83]. Die Aktivierung von *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) führt zur Produktion des *second messenger phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate* (PIP₃) aus dem Substrat *phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate* (PIP₂). PIP₃ rekrutiert nachfolgend eine Untergruppe von Signalproteinen an die Membran, darunter die Serin- und Threonin-Kinase *3'-phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) und Proteinkinase B (AKT). Die Bindung mit PIP₃ führt zu einer Konformationsveränderung in AKT, wodurch Phosphorylierungsstellen

für verschiedene Kinasen freigelegt werden (Abb. 1.3). Die PI3K/AKT-Kaskade führt zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und von anti-apoptotischen Proteinen der BCL-2 Familie [84, 85]. Phosphoryliertes Akt kann sowohl im Zytosol, als auch im Zellkern wirken [86, 87].

STAT3 ist in der Lage die Expression von *Suppressor of Cytokin Signaling 3* (SOCS3) hochzuregulieren. Hierbei hemmt SOCS3 die katalytische Aktivität von Janus-Kinasen, indem SOCS3 mit Hilfe der SOCS3-KIR-Domäne den Tyrosin-phosphorylierten IL-6R in einer SH2-abhängigen und gleichzeitig JAK2 in einer phospho-unabhängigen Weise bindet [88]. Dies führt zu einer negativen Rückkopplungsschleife und somit zur Herabregulierung der gp130-Signale (Abb. 1.3) [89-92].

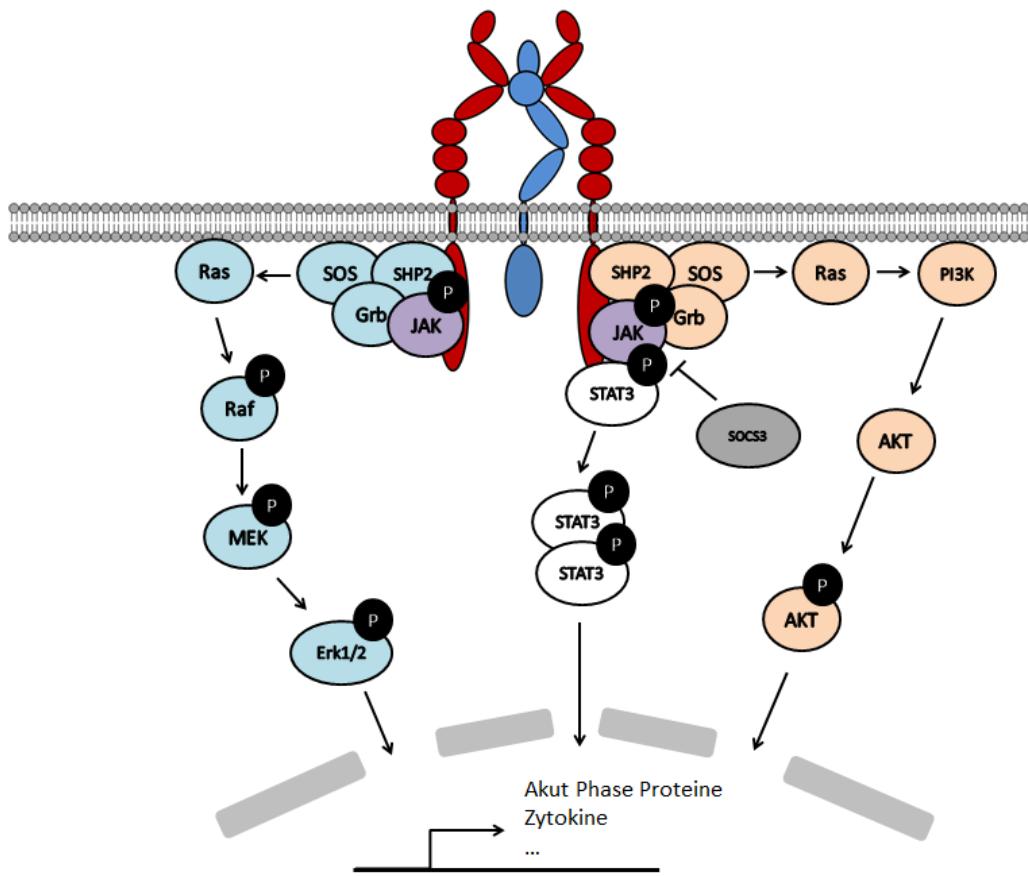


Abb. 1.3: Der IL-6 Signalweg. Bildung des Rezeptorkomplexes induziert JAK-Aktivierung und Phosphorylierung von gp130 an Tyrosinresten. Bindung von SHP2 führt zur Aktivierung der PI3K/AKT-, MAPK- und JAK-STAT-Signalwege. ERK1/2 und AKT phosphorylieren Zielproteine, Effektorproteine und Transkriptionsfaktoren. Das gebildete und phosphorylierte Homodimer aus STAT3-STAT3 wandert in den Zellkern und wirkt als Transkriptionsfaktor.

Gp130 wird ubiquitär exprimiert [66], wohingegen das membrangebundene IL-6R α von Hepatozyten, Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten sowie verschiedenen Epithelzellen exprimiert wird [70]. Aufgrund der limitierten Expression des IL-6R α ist die Bildung von Signalkomplexen zur klassischen IL-6-induzierten Signaltransduktion nur für spezifische Zellen relevant. Durch proteolytische Abspaltung des membranständigen IL-6R α durch extrazelluläre Proteasen der *a disintegrin and metalloproteinase* (ADAM)-Familie nahe der Zellmembran kann ein lösliches IL-6R α (sIL-6R α) erzeugt werden [10, 93].

Dieser IL-6/IL6R α – Komplex kann ebenfalls an gp130 binden und die intrazelluläre Signaltransduktion initiieren. Dieser Signalweg wird als „IL-6 Trans-Signaling“ bezeichnet und erweitert so das Spektrum IL-6 responsiver Zellen [94].

1.4 Lgp130

In früheren Arbeiten unseres Labors wurde eine modifizierte konstitutiv aktive und ligandenunabhängige gp130-Variante entwickelt. Hierbei wurde der extrazelluläre Anteil der gp130-Domäne durch einen basischen Leuzin-Zipper des humanen c-Jun Proteins ersetzt [95]. Diese Regionen des chimären Proteins interagieren miteinander, welches zu einer Dimerisierung führt. Lgp130 Homodimere werden darüber hinaus durch intermolekulare Disulfidbrücken weiter stabilisiert [96, 97]. Zusätzlich wurde eine FLAG-Sequenz C-terminal des Signalpeptids eingeführt. Die Transmembrandomäne, als auch der zytoplasmatische Schwanz von gp130 wurde nicht modifiziert. Dieses Konstrukt wird „Lgp130“ bezeichnet und hat eine Länge von 343 Aminosäuren und eine Masse von 46 kDa (Abb. 1.4) [98].

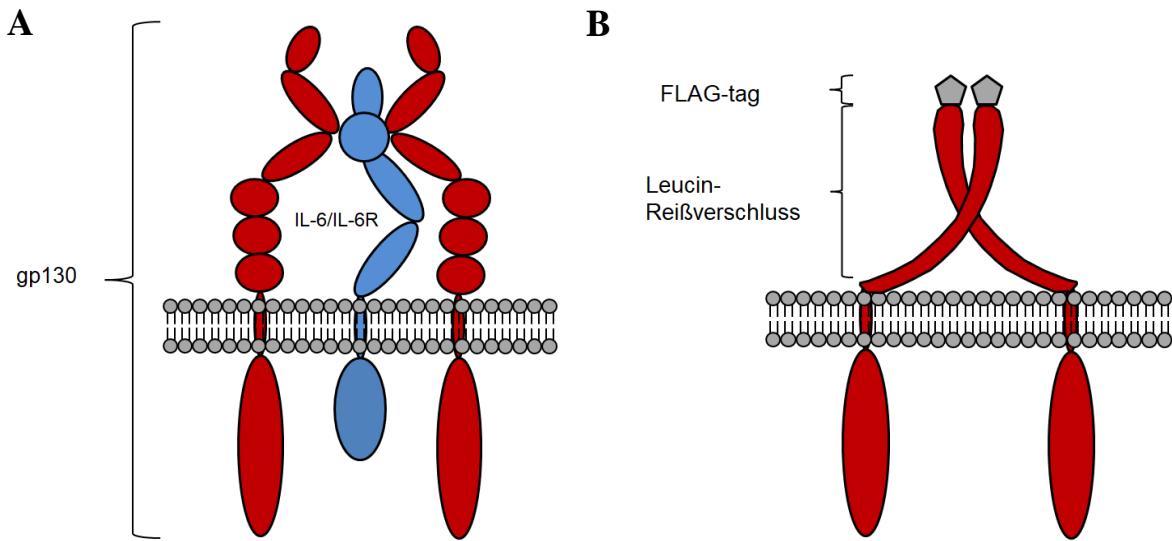


Abb. 1.4: Schematische Darstellung von gp130 und Lgp130. (A) gp130-WT Rezeptor. Signalaktivierung nach Bindung mit IL-6/sIL-6R. (B) Lgp130 mit FLAG-tag (Flag), dem Leucin-Zipper (LZ) und der stabilisierenden Disulfidbrücke (S-S). Modifiziert nach [98].

Um den biologischen Effekt von IL-6 einem einzelnen Zelltyp wie Hepatozyten oder Darmepithelzellen zuzuordnen, wurde ein Mausmodell mit Hepatozyten spezifischer Lgp130 Aktivierung und ein weiteres Mausmodell mit Darmepithelzellen spezifischer Lgp130 Aktivierung generiert. Hierbei wurde eine Lgp130 Expressionskassette, bestehend aus einem CAG Promotor, gefolgt von einer Westphal Stop Kassette, welche von loxP-Seiten flankiert ist, Lgp130 cDNA, einem 2A-Peptid und ein ZsGreen-Reporter, konstruiert. Das 2A-Peptid ist ein virales Strukturmotiv, welches aus viralen Oligopeptiden besteht und der Spaltung der Lgp130 cDNA und des ZsGreen-Reporters während der Translation dient (Abb. 1.5) [99, 100].

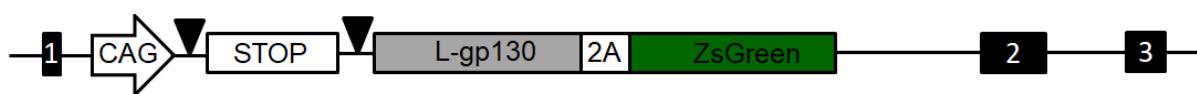


Abb. 1.5: Expressionskassette von Lgp130. Die Lgp130 Expressionskassette besteht aus einem CAG Promotor, gefolgt von einer Cre-Westphal Stop Kassette, der Lgp130 cDNA, einem 2A-Peptid und einem ZsGreen-Reporter. Schwarze Dreiecke kennzeichnen die LoxP-Stellen.

Zur Generierung der R26^{L-gp130} Maus wurde die Lgp130 Expressionskassette in den ROSA26 Lokus durch homologe Rekombination eingefügt. Dieser Lokus wird vorzugsweise zur Erzeugung von Knock-in Mauslinien verwendet, da das Einfügen von Genen in diesen Lokus keine unerwünschten Nebenwirkungen verursacht [101].

Transgene Alb-CreERT² Mäuse exprimieren ein Cre-Östrogenrezeptor Fusionsprotein unter Kontrolle eines Albumin Promoters. Hierbei wurde das CreERT² in den endogenen Alb-Locus inseriert. Die mutierte Form der Ligandenbindungsdomäne des menschlichen Östrogenrezeptors ist an eine Cre-Rekombinase fusioniert, welche spezifisch durch Tamoxifen, aber nicht durch Östradiol aktiviert werden kann. CreERT² weist im Gegensatz zu CreERT, welches eine Punktmutation der menschlichen Östrogenrezeptor-Ligandenbindungsdomäne aufweist, drei Punktmutationen (C400V/M453A/L544A) auf und ist nachweislich sensitiver gegenüber Tamoxifen als CreERT [102]. Das Fusionsprotein ist inaktiv, da es sich im Zytoplasma befindet und erst nach Bindung von Tamoxifen in den Zellkern transloziert [103]. Alb-CreERT² Mäuse zeigen keinen Phänotyp und leiden an keinen gesundheitlichen Beschwerden.

Vil-CreERT² Mäuse exprimieren das CreERT² Fusionsprotein unter Kontrolle eines Villin Promoters in Zotten und Kryptenepithelzellen des Dünn- und Dickdarms [104, 105]. Vil-CreERT² Mäuse zeigen keinen Phänotypen und leiden an keinen gesundheitlichen Beschwerden.

Zur Generierung von Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} und Vil- CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen wurden R26^{Lgp130} mit Alb-CreERT² bzw. Vil-CreERT² Mäusen verpaart.

1.5 Die Leber

1.5.1 Zelluläre Struktur und Funktion

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan, welches eine Vielzahl von Funktionen ausübt. Hierzu gehören unter anderem die Produktion der Gallenflüssigkeit, Entgiftungsfunktionen, der Stoffwechsel von Nahrungsbestandteilen und die Regulierung des Glukosespiegels durch Glykogenspeicherung und Gluconeogenese. Darüber hinaus trägt es zur Bluthomöostase durch Sekretion von Serumproteinen und Gerinnungsfaktoren bei [106].

Die kleinste anatomische Einheit der Leber, das sogenannte Leberläppchen, besteht aus dem Portalfeld, dem Leberparenchym und der Zentralvene. Dort, wo drei Leberläppchen aneinander grenzen, entsteht das Periportalfeld mit der Glisson-Trias, die den Ductus biliferi interlobularis, einer Verzweigung des Gallenganges, die Arteria interlobularis, einem Ast der Arteria hepatica propria und die Vena interlobularis, einem Ast der Pfortader, enthält. Das Portalfeld besteht aus dem Gallengang, der Leberarterie und der Pfortader. Die Leberarterie liefert sauerstoffreiches Blut und die Pfortader liefert nährstoffreiches Blut aus dem Magen-Darm-Trakt, dem Pankreas und der Milz in die Leber. Das nährstoff- und sauerstoffreiche Blut fließt zusammen in die Zentralvene der Leber, wobei die basolaterale Membran von Hepatozyten zu den Lebersinusoiden gerichtet ist und das Leberparenchym bildet. Die apikale Membran der Hepatozyten bildet Gallenkanälchen, durch welche Gallenflüssigkeit in die Gallengänge fließt. Während die Gallengänge von biliären Epithelzellen (Cholangiozyten) ausgekleidet werden, sind Lebervorläuferzellen (LPCs) am Übergang von Gallenkanälchen und Gallengängen, auch Heringkanäle genannt, ansässig (Abb. 1.6) [107].

Die Leber besteht aus verschiedenen Zelltypen. Hierbei stellen Hepatozyten mit fast 80% den hauptsächlichen Zelltyp dar und formen das Leberparenchymgewebe [108]. Cholangiozyten, auch Gallengangsepithelzellen genannt, kleiden die Gallengänge aus. Darüber hinaus besteht die Leber zu etwa 10% aus hepatischen Sternzellen, welche sich im „Disse Raum“ befinden, einer Lücke zwischen sinusoidalen Endothelzellen und Hepatozyten [109]. Hepatische Sternzellen dienen als Fettspeicher, werden als Antigen-präsentierende Zellen angesehen und produzieren nach „Aktivierung“ Extrazellulärmatrix und tragen so zur Regeneration, aber auch Fibrotisierung bei [110, 111]. Ein weiterer Leberzelltyp sind die gewebsresidenten Kupffer-Zellen, bei denen es sich um gewebsresidente Makrophagen mesenchymalen Ursprungs handelt [112, 113]. Rekrutierte Makrophagen, welche aus hämatopoetischen Stammzellen stammen und sich aus zirkulierenden myeloischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark differenzieren, können ebenfalls einen Kupffer-Zellphänotyp annehmen [114].

Kupffer-Zellen tragen durch ihre Zytokinproduktion zur Regulation von Immunreaktionen bei und phagozytieren Bakterien und Viren (Abb. 1.6) [115-117]. Hepatische parenchymale Leberzellen können einen Einfluss auf verschiedene immunologische Reaktionen durch Sekretion von Chemokinen, Zytokinen und Akut-Phase-Proteinen in der Leber haben (s. Abschnitt 1.5.2).

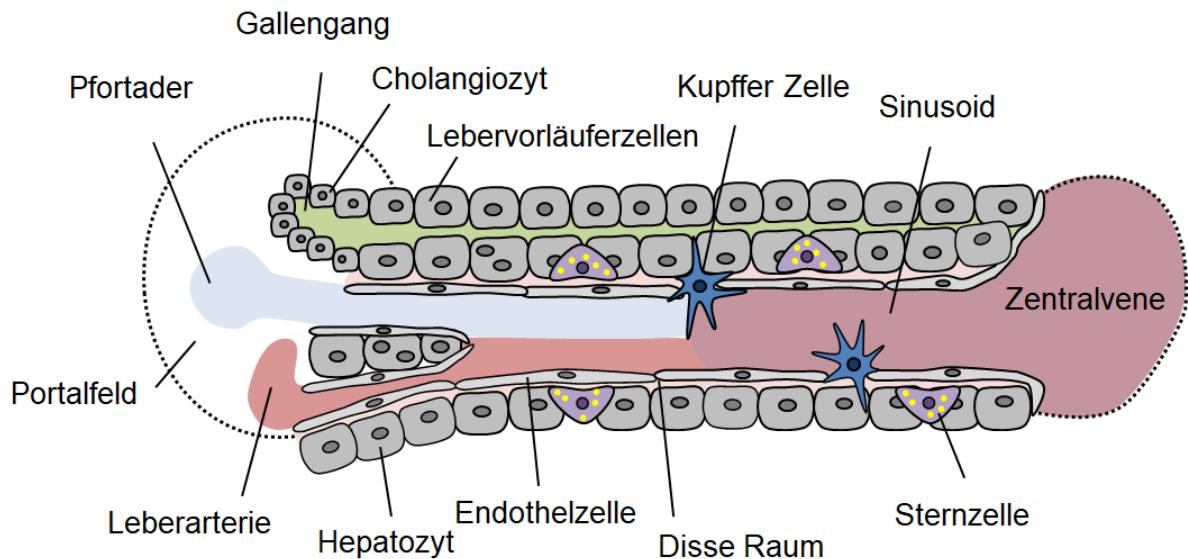


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Leberaufbaus. Die Leber besteht aus den 5 Leberzelltypen Hepatozyten, Endothelzellen, Sternzellen, Kupfferzellen, Cholangiozyten. Die duale Blutversorgung aus Pfortader (sauerstoffarmes Blut) und Leberarterie (sauerstoffreiches Blut) vereinigt sich beim Eintritt in das Leberläppchen und tritt an der Zentralvene aus. Modifiziert nach [118].

Die Leber ist funktionell mit dem Gastrointestinaltrakt verbunden, da das venöse Blut aus dem Darm in die hepatische Blutversorgung gelangt. Hierdurch ist die Leber kontinuierlich mit Antigenen aus der Nahrung und Molekülen aus der Mikroflora des Darms konfrontiert, was Entzündungspotentiale darstellt, aber auch das spezielle tolerogene Immunmilieu der Leber erklärt [119].

1.5.2 Akut-Phase-Reaktion

Die Akut-Phase-Reaktion ist eine evolutionär konservierte systemische Erstreaktion auf lokale und systemische Störungen wie Infektionen, Gewebeschäden, Tumorwachstum und immunologische Störungen [120, 121].

Innerhalb weniger Stunden nach einer Infektion verändert sich das Muster der Proteinsynthese in der Leber, wobei insbesondere das IL-6/gp130 Signalmodul für die Produktion und Sekretion der Akut-Phase-Proteine entscheidend ist [1, 122, 123]. Dies führt zu einem Anstieg von positiven Akut-Phase-Proteinen wie C-reaktives Protein (CRP), Serum Amyloid A1 (SAA1), Serum Amyloid A2 (SAA2), Serum Amyloid P (*ApCs*) und Haptoglobin (*Hpt*). Die hepatische RNA-Hochregulierung dieser Akut-Phase-Proteine ist mit einer Abnahme der Synthese negativer Akut-Phase-Proteine wie Albumin verbunden [1, 30, 124], was für die Synthese an Aminosäuren, welche für die Produktion positiver Akut-Phase-Proteine zur Verfügung stehen, erhöht [123, 125].

Die Akut-Phase-Reaktion ist von den Transkriptionsfaktoren STAT3 und *Nuclear factor κB* (NF-κB) abhängig. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine hepatocytenspezifische Deletion beider Transkriptionsfaktoren die Bildung von Akut-Phase-Proteinen aufhebt [126]. Sowohl der IL-1 Signalweg, als auch der TNF-Signalweg aktivieren die NF-κB Familie von Transkriptionsfaktoren. Hierbei wird die Aktivierung von NF-κB durch zytokinabhängige Phosphorylierung und anschließenden Abbau des inhibitorischen Proteins *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor* (IκB) erreicht [127]. IL-1 β Knockout Mäuse zeigten in Studien eine beeinträchtigte Akut-Phase-Reaktion bei induzierten lokalen Entzündungen und Gewebeschädigungen [128]. Aktivierte myeloide Zellen können inflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF α freisetzen, was zu einer erhöhten Produktion und Sekretion von IL-6 von anderen Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten und myeloiden Zellen, und zu einer positiven Rückkopplungsschleife führt [129]. Mäuse mit einer Interferon-induzierten STAT3 Deletion in der Leber und im Knochenmark zeigten ebenfalls eine reduzierte Induktion von Akut-Phase-Proteinen [130]. Bei IL-6 Knockout Mäusen konnte ebenfalls eine Notwendigkeit des IL-6/gp130 Signalweges und des Transkriptionsfaktors STAT3 für die Induktion von Akut-Phase-Proteinen aufgezeigt werden [43, 44]. Ebenso konnte beim Menschen eine Beeinträchtigung der Sekretion der Akut-Phase-Proteine durch Mutationen mit resultierendem Funktionsverlust (*Loss-of-function* Mutation) in gp130 [131] bzw. IL-6R α [132] nachgewiesen werden.

Das Akut-Phase SAA-Protein kann als Reaktion auf Gewebeschäden in Extremfällen innerhalb von 24-48 h um ein 1000-faches bis zu einer Konzentration über 1mg/ml ansteigen [133, 134]. SAA gehört zur Familie von Apolipoproteinen, welche nach der Synthese an Lipoproteine mit hoher Dichte (*High-Density Lipoprotein HDL*) binden [133]. Hierbei bilden die beiden SAA Isoformen SAA1 und SAA2 das „Akut-Phase SAA“ (im Folgenden als Akut-Phase SAA-Protein oder SAA bezeichnet) und werden in der Leber synthetisiert, während die ausschließlich in Mäusen vorkommende Isoform SAA3 an extrahepatischen Stellen exprimiert wird [133, 135, 136]. SAA4 wird konstitutiv exprimiert und reagiert nur geringfügig auf inflammatorische Stimuli [137, 138]. Die Akut-Phase SAA-Proteine signalisieren über die Bindung und Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren wie die Toll-like-Rezeptoren (TLR)-2 und -4 [139, 140], den Formylpeptidrezeptor 1 (FPRL1) [141, 142], den Klasse-B-Scavenger-Rezeptor CD36 [140, 143] und den ATP-Rezeptor *Purinergic Receptor P2X 7* [144]. Als Akut-Phase-Protein beeinflusst SAA den Cholesterinstoffwechsel während der Entzündungsreaktion [145, 146]. SAA führt darüber hinaus zur Adhäsion und Chemotaxis von phagozytotischen Zellen und Lymphozyten sowie zur Rekrutierung von Monozyten und polymorphonuklearen Zellen (PMN) an Entzündungsstellen [147, 148].

Patienten mit chronischen Entzündungskrankheiten wie der rheumatoide Arthritis mit stetig erhöhten SAA-Blutplasmakonzentrationen weisen im Verlauf ihrer Krankheit ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Amyloid A (AA) Amyloidose auf [149, 150]. SAA ist eine Hauptkomponente von Amyloidfibrillen. Menschliche und murine Amyloidfibrillen sind fadenförmige Polypeptidaggregate mit einer Kreuz- β -Struktur [151] und bestehen aus dem C-terminal verkürzten SAA1-Protein. Dieses entsteht durch die proteolytische Spaltung von SAA durch Matrix-Metalloproteasen (MMP) [152, 153]. Amyloidfibrillen stehen im menschlichen Körper im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen, systemischer Amyloidose, Typ-II-Diabetes und „normaler“ Alterung [154, 155]. Bei der reaktiven systemischen (AA)-Amyloidose gelangt das Fibrillenvorläuferprotein (SAA) nach der Synthese in das Blutplasma. Dies kann zu massiven Ablagerungen von Amyloidfibrillen in Milz, Leber und Nieren führen [135, 150, 156]. Die Hauptursache für die Schwächung des Patienten bei AA-Amyloidose ist das von der Niere niedergelegene Nierenamyloid. Die Nieren sind eines der am häufigsten betroffenen Organsysteme der AA-Amyloidose. Nierenamyloidose kann zu einer Nierenerkrankung im Endstadium und progressivem Nierenversagen mit manchmal tödlichem Ausgang führt [157].

1.6 Der Gastrointestinaltrakt

1.6.1 Aufbau

Der Gastrointestinaltrakt besteht aus der Speiseröhre, dem Magen, dem Dünndarm und dem Dickdarm, wobei die Hauptaufgabe in der Verdauung und Absorption von zugeführter Nahrung liegt. Nach der ersten enzymatischen Aufspaltung und Homogenisierung der Nahrungsbestandteile im Magen wandert der Nahrungsbrei weiter in den Dünndarm, wo er durchmischt und die Nahrung absorbiert wird.

Der Dickdarm, welcher für die Elektrolyt- und Wasserrückresorption verantwortlich ist, wird in drei Abschnitte gegliedert: das *Caecum* (Blinddarm) mit dem *Appendix veriformis* (Wurmfortsatz), der *Colon* (Grimmdarm) und das *Rektum* (Mastdarm). Der Dickdarm weist den gleichen Darmschichtenaufbau wie der Dünndarm auf, jedoch besitzt er keine Zotten. Darüber hinaus sind die Krypten im Dickdarm flacher und weniger dicht als im Dünndarm.

Die Darmwand des Colons besteht von außen zum Lumen hin aus der Serosa, der Muskularis, Submukosa und Darmschleimhaut (Mukosa) aufgebaut. Der äußere Teil des Dickdarms ist von Serosa, einer subserösen Bindegewebs- und Fettschicht, umschlossen. Die äußere Schicht der Serosa besteht aus einem einschichtigen Plattenepithel (Mesothel). Die Serosa ist eine Verschiebeschicht, wobei die Mesothelzellen einen feinen Flüssigkeitsfilm sezernieren und so zur Gleitfähigkeit der verschiedenen Serosablätter gegeneinander beitragen. Unter dem Mesothel liegt die Bindegewebsschicht, welche aus Nervenfasern, Blut- und Lymphgefäßen besteht. Die Muskularis besteht aus dem inneren Ringmuskel und der äußeren Längsmuskelschicht, der für die Muskelkontraktion (Darmperistaltik) und der damit verbundenen Beförderung des Verdauungsinhaltes verantwortlich ist. Diese beiden Muskelschichten sind von Serosa umgeben. Die Darmschleimhaut (Mukosa) besteht aus den drei Abschnitten *Muscularis mucosae*, *Lamina propria* und dem *Darmepithel* und befindet sich innenliegend von der Submukosa. Hierbei trennt die *Muscularis mucosae* die Mukosa von der Submukosa. Die *Lamina propria* besteht aus Bindegewebe und beinhaltet zahlreiche Immunzellen. Das *Darmepithel* bildet eine einzellige intestinale Epithelschicht, welche als Barriere zwischen innerem Darmlumen und *Lamina propria* fungiert (Abb. 1.7) [158].

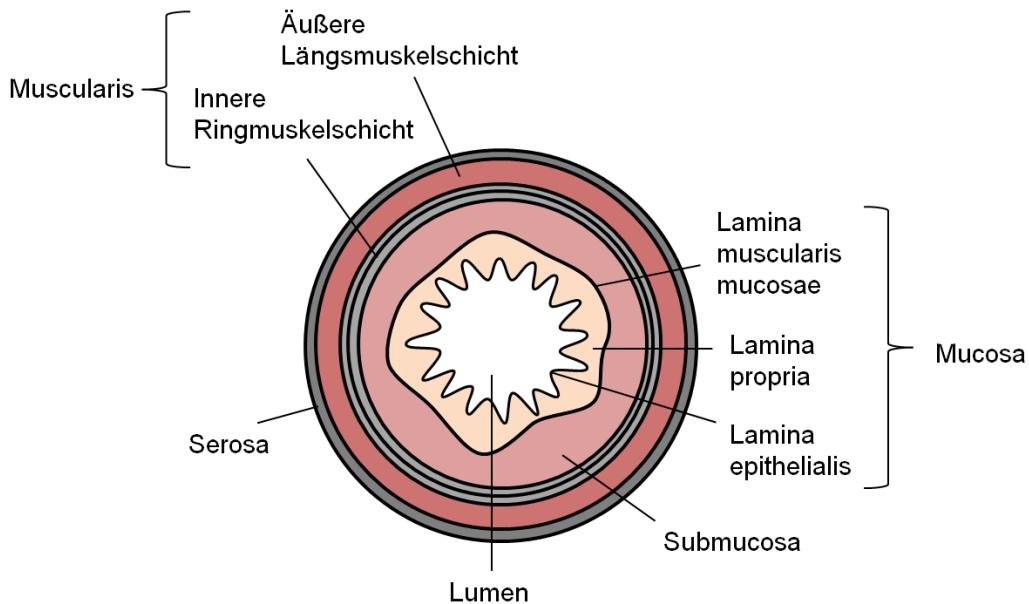


Abb. 1.7: Der Colonquerschnitt. Das Colon besteht von außen nach innen aus der Serosa, der Muscularis, der Submucosa und der Mucosa. Die Muscularis teilt sich auf in die äußere Längsmuskelschicht und die innere Ringmuskelschicht. Die Mucosa besteht von außen nach innen aus der Lamina propria, der Lamina muscularis mucosae und der Lamina epithelialis.

Der Dünndarm gliedert sich in die drei Abschnitte *Duodenum* (Zwölffingerdarm), *Jejunum* (Leerdarm) und *Ileum* (Krummdarm). Die Hauptaufgabe des Dünndarms ist die Absorption von Nährstoffen. Hierfür bildet die Darmschleimhaut (Mukosa) Schleimhautfalten, auch Kerckringsche Falten genannt, zur Oberflächenvergrößerung und effizienterer Nährstoffaufnahme. Zur weiteren Oberflächenvergrößerung weisen die Kerckringsche Falten auf ihrer Oberfläche Zotten auf. Diese besteht aus einschichtigen intestinalen Epithelzellen, wobei die Invagination der Darmschleimhaut Krypten genannt werden. Die Krypten enthält die untere Stammzellzone und das obere Transit-Amplifikations-Kompartiment (TA), welche für die Differenzierung intestinaler Epithelzellen entlang der Krypten-Villus-Einheit verantwortlich sind. Die intestinale Darmepithelschicht besteht aus den ausdifferenzierten Enterozyten, Becherzellen, Paneth-Zellen und intestinalen epithelialen Stammzellen [158]. Die Kryptenbasis beinhaltet säulenförmige Stammzellen (*crypt base columnar cells*) und Stammzellen der Position +4. Säulenförmige Stammzellen sind stark proliferativ und exprimieren die Markerproteine *Leucin rich motif G--protein coupled receptor-5* (Lgr5) und *achaete scute-like 2* (Ascl2) [158-160]. Stammzellen der Position +4 befinden sich vier Zellen oberhalb des Kryptenbodens und sind negativ für Lgr5 und Ascl2. Sie werden als ruhende Stammzellen bezeichnet und sind nur wenig proliferativ [161].

Neben den intestinalen epithelialen Stammzellen, welche durch ihre ständige Neubildung zum Erhalt der intestinalen Epithelschicht beitragen, befinden sich Paneth-Zellen im Kryptenboden [162]. Die Paneth-Zellen sezernieren zur Immunabwehr Lysozyme und anti-mikrobielle Peptide [163]. Sie können unter pathologischen Bedingungen ebenso zu intestinalen Stammzellen differenzieren. Intestinale epithiale Stammzellen sind in Paneth-Zellen eingebettet, wodurch die Paneth-Zellen die intestinale Stammzellnische bilden. Darüber hinaus können Paneth-Zellen aber auch die Stammzellproliferation durch Absonderung von Hormonen oder Stoffwechselzwischenprodukten regulieren. Paneth-Zellen produzieren hierbei sekretierende Proteine wie z.B. *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Wingless-type* (Wnt)-3a und die Notch-Liganden *Delta-like canonical Notch ligand 1* (DLL1) und 4 [164, 165]. $Lgr5^+$ Stammzellen teilen sich täglich und differenzieren zu neuen Darmepithelzellen des TA-Kompartiments. Die Zellen des TA-Kompartiments teilen sich hingegen viermal täglich [158]. Während der Differenzierung bewegen sich Enterozyten und Becherzellen an das apikale Kryptenende, lösen sich von der extrazellulären Matrix und werden in das Darmlumen abgestoßen (Anoikis) [166]. Zur Oberflächenvergrößerung und verbesserten Resorption der Nährstoffe besitzen Enterozyten fadenförmige Ausstülpungen der Zellmembran (Mikrovilli) an der luminalen Seite. Becherzellen sezernieren verschiedene Muzine. Muzine, insbesondere Muzin 2, bilden einen intestinalen Schleimfilm, der das Epithel wie eine Schutzschicht bedeckt. Muzin 2 ist ein Glykoprotein und bildet eine Barriereforschicht zwischen Darmepithel und Darmflora. Dadurch wird verhindert, dass der saure Magenbrei und Bicarbonate das Epithel zerstören (Abb. 1.8) [167].

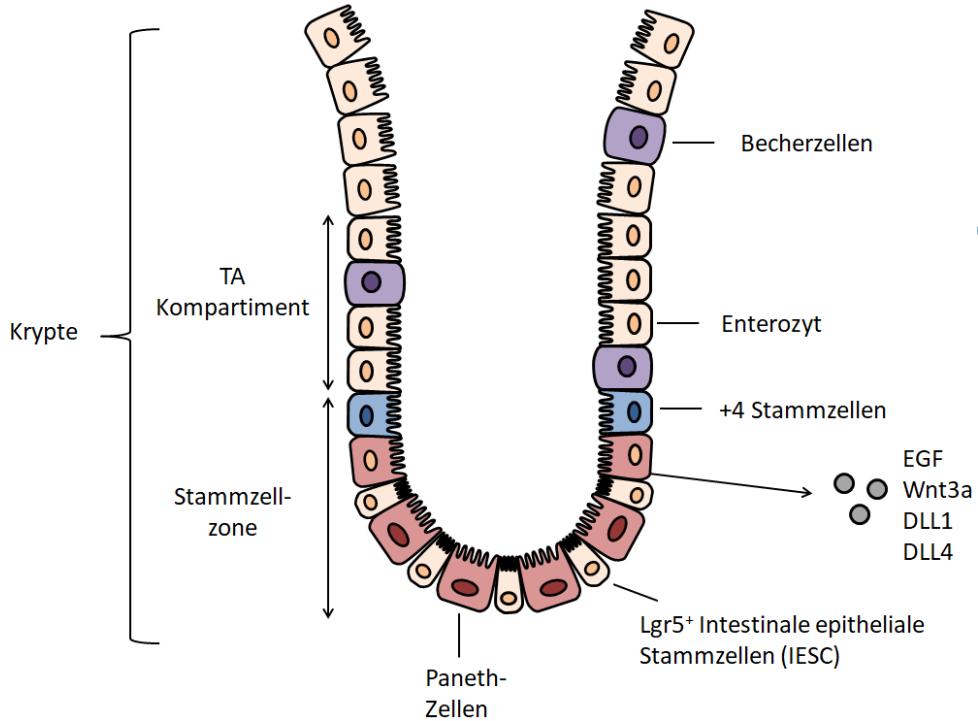


Abb. 1.8: Struktur und zelluläre Zusammensetzung der Krypten. Die Kryptenbasis besteht aus Lgr5+ intestinalen epithelialen Stammzellen (IESC), die mit Paneth-Zellen durchsetzt sind. Paneth-Zellen sezernieren EGF, Wnt3a, DLL1 und DLL4. +4 Stammzellen können nach Verletzungen das Stammzellkompartiment wiederherstellen. Das obere TA-Kompartiment besteht aus ausdifferenzierten Enterozyten und Becherzellen. Erreichen die Zellen das Kryptenende, lösen sie sich von der extrazellulären Matrix (ECM) und werden in das Darmlumen abgestoßen, wo sie durch Anoikis absterben.

Die Integrität der Barrièreschicht zwischen Darmepithel und Darmflora stellt einen wichtigen Teil der Immunhomöostase dar. Ein Verlust oder eine Beschädigung dieser Barrièreschicht kann das Eindringen von Pathobionten und unverdauten Nahrungspartikeln begünstigen [168], welches zu Entzündungsreaktionen führen kann [169].

Die Expression von Akut-Phase-Proteinen wie den SAA-Isoformen kann neben Hepatozyten in der Leber auch in anderen Zellen in extrahepatischen Bereichen des Darms durch Bakterien oder inflammatorische Zytokine wie IL-6 und IL-1 β induziert werden [133]. So führte eine Besiedlung mit *segmented filamentous bacterium* (SFB) in keimfreien Mäusen (germ-free mice) zu einer Induktion epithelspezifischer Gene der Akut-Phase-Reaktion wie den drei SAA-Isoformen im terminalen Ileum [170]. Darüber hinaus zeigten Mäusen mit STAT3 Deletion in intestinalen Epithelzellen signifikant reduzierte Transkripte der Akut-Phase-Proteine *Saa1* und *Saa2* [59].

1.6.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (*inflammatory bowel disease* IBD), werden durch permanente und rezidivierende Entzündungen im Gastrointestinaltrakt charakterisiert [171]. Zu den zwei häufigsten entzündlichen Darmerkrankungen gehören Colitis ulcerosa (*Ulcerative colitis*, UC) und Morbus Crohn (*Crohn's disease*, CD). Hierbei begrenzt sich die Entzündung im intestinalen Schleimhautgewebe bei der UC auf den Dickdarm, während bei der CD alle Abschnitte des Gastrointestinaltraktes betroffen sein können, auch extra-intestinal. Die CD ist durch ein diskontinuierliches Befallsmuster gekennzeichnet. Neben entzündeten Bereichen können hierbei auch vollständig intakte Darmabschnitte auftreten [172, 173].

Epidemiologische Studien zeigen, dass die Inzidenz beider Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten angestiegen ist [174]. Hierbei entwickeln insbesondere Menschen in Industriestaaten wie Nordamerika und Nordeuropa eine IBD. Dies liegt an der höheren Prävalenz von Risikofaktoren wie einer Zucker- und fetthaltige Ernährungsweise und erhöhtem Stress. Gleichzeitig kann auch die häufige Einnahme von Medikamenten die Entwicklung einer IBD begünstigen [172, 173]. Als weitere Risikofaktoren für IBD werden genetische Faktoren [175] und eine gestörte Interaktion der physiologischen Darmflora [172] aufgeführt. Die Darmmukosa stellt aufgrund ihres Abwehrmechanismus von kommensaler und pathogener Bakterien eine wichtige physikalische Barriereforschicht im Darm dar. Daher sind Barrieredefekte der Darmmukosa, welche auf genetische Mutationen zurückzuführen sein können, weitere Risikofaktoren für die Entstehung von IBD dar [176, 177].

Diarröhö, blutiger Stuhl, starker Appetitverlust, Gewichtsverlust, Fieber und teilweise ebenso Unterleibsschmerzen stellen typische Symptome beider Erkrankungen dar [178]. Die wiederkehrende Entzündung kann die Bildung von Aphten und Fisteln begünstigen und auch extraintestinale Begleiterkrankungen wie Osteoporose, Psoriasis, Morbus Bechterew und Cholelithiasis begünstigen [179]. Histopathologisch zeigen Patienten mit UC charakteristische Störungen der Kryptenarchitektur, Infiltrationen von Lymphozyten in die Lamina propria, sowie eine Erosion der Darmschleimhaut [180], während Patienten mit CD diskontinuierliche Störungen der Kryptenarchitektur sowie Lymphozyten- und Plasmazellinfiltrate aufweisen [181].

Die Pathophysiologie von IBD wird durch einen Überschuss an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-17, IL-22 und IL-23 charakterisiert, welches zu einer Dysregulation von angeborenen und adaptiven Immunsystem führt [182, 183]. In IBD-Patienten wurde eine

erhöhte Induktion von IL-23 durch Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und Granulozyten nachgewiesen. IL-23 vermittelt die Aktivierung und Zytokinproduktion anderer Immunzellen wie T-Lymphozyten, als auch angeborener lymphoider Zellen (ILCs), was zur Induktion sekundärer entzündungsfördernder Zytokine wie IL-17 und IL-22 führt [184-186]. IL-17A, IL-22 und IL-23 aktivieren nachfolgend NF-κB und den JAK-STAT-Signalweg und können zur Aktivierung der Akut-Phase-Reaktion führen.

1.6.3 Darmkrebs

Darmkrebs (*colorectal cancer* CRC) ist eine der häufigsten diagnostizierten Tumorerkrankungen und ist eine der Hauptursachen für krebsbedingten Tod bei Männern und Frauen. In Industriestaaten entwickeln mehr als 4% der Bevölkerung im Laufe ihres Lebens CRC [187]. Dies liegt an der höheren Prävalenz von Risikofaktoren wie dem hohen Konsum von Kohlenhydraten, fettreichen Speisen [188] und dem Tabakkonsum [189], als auch an dem höheren Durchschnittsalter der westlichen Bevölkerung. So werden 70 % der Patienten mit CRC in einem Alter von 50-80 Jahren diagnostiziert [190]. Weitere Risikofaktoren stellen Diabetes [191] und entzündliche Darmerkrankungen dar. So haben Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ein erhöhtes Risiko an Kolitis-assoziiertem Krebs (*colitis-associated cancer* CAC) zu erkranken [39-41].

Verschiedene Studien konnten Mutationen wie z. B. Mutationen im *adenomatösen Polyposis coli*-Gen (APC) [192] und im p53-Gen [193] mit dem kolorektalen Karzinom in Verbindung bringen. Der Verlust des Tumorsuppressorgens *APC* führt zu einer Aktivierung und Dysregulation des Wnt-β-Catenin-Signalweges. *APC* bindet nukleäres β-Catenin und exportiert es ins Zytoplasma, wo es durch einen Komplex verschiedener Proteine phosphoryliert wird [194]. Das phosphorylierte β-Catenin wird ubiquitiniert und proteasomal abgebaut [195]. Eine Mutation im *APC*-Gen verhindert den Abbau von β-Catenin. In Folge dessen steigt der β-Catenin-Spiegel im Zytoplasma und im Zellkern, was zu einer dysregulierten Expression von Wnt-Zielgenen wie c-myc [196] und Cyclin D1 [197] führt [198]. Hierdurch findet eine verstärkte Proliferation von Darmepithelzellen, eine verzögerte Migration entlang der Krypten-Villus Einheit und eine verminderte Zelldifferenzierung statt [199, 200]. Darüber hinaus führt der Verlust des Tumorsuppressors *APC* zu einer Störung bei der Chromosomen-Segregation [201, 202]. Da das *APC*-Gen eine entscheidende Rolle für die Chromosomenstabilität spielt, führt dessen Funktionsverlust zu einer Instabilität auf

chromosomaler Ebene. Dies kann zu einem Verlust oder Zugewinn von Chromosomenmaterial führen, u. a. eine Aneuploidie oder Polyploidie von Zellen zur Folge haben und die Tumorigenese auslösen [203].

Das Tumorsuppressorprotein p53 wird als Reaktion auf verschiedene Stresssignale wie DNA-Schäden, oxidativer Stress und hyperproliferative Signale aktiviert. Dies führt zu einer Akkumulation des p53-Proteins in den Zellen. Das aktivierte p53-Protein bindet an spezifische DNA-Sequenzen in seinen Zielgenen und reguliert deren Expression [204]. Hierdurch werden zelluläre Reaktionen wie Apoptose, Zellzyklusarrest, zelluläre Seneszenz, DNA-Reparatur, Angiogenese und die antioxidative Abwehr reguliert [205-207]. Mutationen im Tumorsuppressorprotein p53 treten meistens in der DNA-Bindungsdomäne auf, was die Transkriptionsaktivität von p53 beeinträchtigt. Dies führt zu einer Dysregulation des Zellzyklus und der Apoptose [205].

Ein wichtiger Aspekt bei der Tumorentwicklung und -wachstum von entzündungs-assoziiertem Darmkrebs stellen Immunzellen und pro-inflammatorische Zytokine dar, welche das Wachstum und das Überleben bösartiger Zellen begünstigen [208]. Der NF-κB-Signalweg und der STAT3-Signalweg stellen wichtige Komponenten bei der Regulierung der Zytokinsekretion und der intrinsischen Aktivierung verschiedener Zelltypen während der Tumorentwicklung dar. Hierbei fördern die Zytokine IL-1β, IL-6, IL-17, IL-22, IL-23 und TNFα die Tumorentstehung und das Fortschreiten von entzündungs-assoziiertem Darmkrebs [209]. Die NF-κB-Aktivierung in Makrophagen führt zur Sekretion von IL-1β, IL-6 und TNFα, was wiederum die NF-κB- und STAT3-Signalübertragung in Darmepithelzellen während der kolitisassoziierten Karzinogenese aktiviert [210, 211]. Dies hat eine proliferationsfördernde Wirkung und ein höheres Überleben maligner Zellen zur Folge [212]. Darüber hinaus zeigten Studien, dass die STAT3-Aktivierung in Makrophagen zu einer Expression von IL-23 führt. Dies hemmt die Expression von IL-12p35 in Tumor-assoziierten dendritischen Zellen und induziert die Transkription des FoxP3-Gens in regulatorischen T-Zellen. Als Folge dessen wird das immunsuppressive IL-10 sekretiert [213]. Neben Makrophagen kann IL-23 ebenso von dendritischen Zellen und Granulozyten induziert werden. Dies hat eine Aktivierung von anderen Immunzellen wie T-Lymphozyten, als auch angeborenen lymphoiden Zellen (ILCs) und eine Zytokinproduktion von IL-17 und IL-22 zur Folge [184, 185]. IL-17 wird ebenso in einer STAT3-abhängigen Weise von T-Zellen exprimiert und moduliert die IL-6 Signalübertragung, was zu einer STAT3-Aktivierung in Tumorzellen führt [214].

Im Mausmodell mit Kolitis-assoziierter Karzinogenese, wo eine zelltypspezifische Deletion von I_KB kinase (IKK) β die NF- κ B-Aktivierung in myeloischen Zellen hemmte, konnte eine verringerte Proliferation von prämalignen intestinalen epithelialen Zellen aufgezeigt werden [210]. Ebenso wiesen Mäuse mit spezifischer Ablation von STAT3 in Darmepithelzellen eine verringerte Tumorbildung und verringertes Tumorwachstum bei Kolitis-assoziiertem Darmkrebs auf [54].

Bei verschiedenen Studien wurde eine erhöhte Expression von IL-6 bei Patienten mit Darmkrebs sowohl im Serum als auch im Tumorgewebe festgestellt [215, 216]. Neben der proliferationsfördernden Wirkung von IL-6 konnte ebenso eine erhöhte Apoptoseresistenz in Darmepithelzellen bei Darmkrebspatienten nachgewiesen werden [217]. Das Azoxymethan (AOM)/ Dextran-Sodium-Sulfat (DSS)-Kolitis-Mausmodell, welches ein Kolitis-assoziiertem Darmkrebs-Modell in Verbindung mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankungen darstellt und durch DNA-Schäden in intestinalen Epithelzellen ausgelöst wird, ermöglicht die Analyse von Darmkrebs in Mäusen [218, 219]. Im AOM/DSS-Kolitis-Mausmodell zeigten Mäuse IL-6 abhängiges Wachstum von Darmtumoren. Hierbei wurde das Tumorwachstum durch IL-6 Trans-Signaling über die lösliche Form des IL-6R α in Darmepithelzellen gesteuert und nicht durch den membrangebundenen IL-6R vermittelt [220]. IL-6 Trans-Signaling induziert hierbei die Aktivierung von STAT3 und die Produktion der anti-apoptotischer Faktoren *B-cell lymphoma-extra large* (bcl-xl) und *B-cell lymphoma 2* (bcl-2) in T-Zellen, was Kolitis-assozierte Kolonkarzinome begünstigen [85, 220]. IL-6 abhängige STAT3 Aktivierung in Tumorzellen *in vivo* hat darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Hemmung der Apoptose [54]. Mäuse, welche eine erhöhte Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges durch spezifische STAT3 Hyperaktivierung in intestinalen Epithelzellen aufweisen, zeigten ebenso eine erhöhte Prädisposition für Darmkrebs, wobei ein Defekt des IL-6/STAT3-Signalweges zu einer Beeinträchtigung der Darmentzündung im Darmkrebs-Modell führte [221, 222].

2 Fragestellung

Das Zytokin IL-6 ist an verschiedenen Entzündungs- und Regenerationsprozessen beteiligt und signalisiert über die signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit gp130. Da viele Zelltypen auf IL-6 reagieren, ist es schwer einem einzelnen Zelltypen einen spezifischen biologischen Beitrag zuzuordnen.

Daher wollen wir die Auswirkungen von Hepatozyten- und intestinalen Epithelzellen-spezifischer gp130 Aktivierung auf die Leber- und Darmentzündung, sowie die Tumorbildung untersuchen. Zu diesem Zweck analysieren wir zunächst Mäuse mit Hepatozyten-spezifischer und konstitutiv aktiver gp130 Aktivierung. Um kurzweilige und Langzeitauswirkungen zu untersuchen, werden wir die Leber und umgebenen Organe zu verschiedenen Zeitpunkten untersuchen.

Mit Hilfe einer induzierten DSS-Kolitis werden wir die Auswirkungen von Hepatozyten-spezifischer gp130 Aktivierung auf die Darmentzündung untersuchen um Aufschluss über das Zusammenspiel von Leber und Darm zu erhalten. Schließlich wollen wir die Auswirkungen von Lgp130 Expression in Hepatozyten auf die Tumorentstehung im AOM/DSS-Kolitis Modell analysieren.

Im weiteren Verlauf werden wir Mäuse mit intestinalen Epithelzellen-spezifischer gp130 Aktivierung untersuchen. Hierbei soll analysiert werden, ob eine gp130 Aktivierung in intestinalen Epithelzellen direkten Einfluss auf die Darwmorphologie hat. Um die Effekte von zellautonomer gp130 Aktivierung auf die Darmentzündung und strukturelle Veränderungen zu analysieren, wird eine induzierte DSS-Kolitis durchgeführt. Um zu untersuchen, welche Rolle eine gp130 Aktivierung in intestinalen Epithelzellen bei der Tumorbildung bei Kolitis-assoziiertem Darmkrebs hat, wurde ein AOM/DSS-Kolitis Modell durchgeführt.

Histologische Analysen der Leber und des Darms sollen hierbei zeigen, ob es zu strukturellen Veränderungen und Tumorinduktionen kommt. Neben histologischen Untersuchungen sollen hierbei molekularbiologische, zellbiologische und biochemische Methoden verwendet werden.

3 Material & Methoden

3.1 Material

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Materialien von Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim) oder AppliChem (Darmstadt) bezogen.

3.1.1 Chemikalien

Tab. 3.1 Chemikalien

Material	Hersteller (Best. Nr.)
<i>Antibody Diluent Reagent Solution</i>	Thermo Scientific (003218)
Azoxymethan (AOM)	Sigma-Aldrich (A5486)
<i>Dako Protein Block Serum-Free</i>	Agilent (X090930-2)
Dextran-Sodium-Sulfat (DSS)	MP Biomedicals (9011-18-1)
<i>Dulbecco`s Modified Eagles`s medium</i>	Thermo Scientific (31966047)
FCS	PAN Biotech (P30-3033)
Histokitt II	Carl Roth (T160.1)
NucleoZOL	Macherey-Nagel (740404.200)
<i>OCT TissueTek Compund</i>	Plano GmbH (R1180)
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific (26616)
PBS ohne CaCl ₂ /MgCl ₂	Thermo Scientific (14190169)
PEI	Polysciences (23966-100)
Tamoxifen	Sigma-Aldrich (T5648)
<i>Trypsin-EDTA solution 0,25 %</i>	Thermo Scientific (25200056)

3.1.2 Primer

Tab. 3.2 Primer für genomische DNA

Target	Primer (5`-3`)	Primer (5`-3`)	Erwartete Bandengröße
Alb-CreERT ²	ATCATTCTTTGTTTCAGG (WT) TTAAACAAGCAAAACCAAAT (TG)	GGAACCCAAACTGATGACCA	229 bp (WT) 444 bp (TG)
Lgp130	TGTCGAAATTAACTGTGAATC (TG) GATATGAAGTACTGGGCTCTT (WT)	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTATC (TG+WT)	WT 570 bp TG 380 bp
Vil-CreERT ²	CGAGTGATGAGGTTCGCAAG	TGAGTGAACGAACCTGGTCG	TG 390 bp

Tab. 3.3 Primer für quantitative Real-Time PCR unter Verwendung des Roche Universal Probe Library (UPL) Systems

Target	Primer (5`-3`)	Primer (5`-3`)	UPL
Alb	AGTGTGTGCAGAGGCTGAC	TTCTCCTTCACACCATCAAGC	27
ApCs	CAAGGCGGCAGAGTTCAC	GGAGAGGATTTTATTGGCAGA	50
C3	ACAGGAGCCAGTGGACATCT	TGTGCCCTCCTTATCTGAG	20
CXCL1	AGACTCCCAGCCACACTCCAA	TGACAGCGCAGCTCATTG	52
Fabp1	CCATGACTGGGGAAAAAGTC	GCCTTGAAAGTTGTCACCAT	11
Hpt	GGCAAGAGAGGTCCACGAT	CCACAGCAAAAAGCTGACC	15
IL17ra	TGTGTTGCATGTTGAGTGG	GGACGGACAGCTCTGCAC	89
Lgp130	CAAAGATGACGATGATAAAGAATTG	GCTCCGAGTTCTGAGCTTTC	19
Prg4	GAAAATACTTCCCGTCTGCTTG	TCTCCCTGCACAGCTTGATA	38
Saa1	CCAGGATGAAGCTACTCACCA	TAGGCTCGCCACATGTCC	32
Saa2	TTCATTATTGGGGAGGCTTT	GCCAGCTTCCTTCATGTCAG	19
SerpA1	CTTGGCTCCCATTGCTTAAA	CATGAGATGGAGGGAGTCATT	73
Tub1a	CTGGAACCCACGGTCATC	GTGGCCACGAGCATAGTTATT	88
ZsGreen	ATCTGCAACGCCGACATC	CTTGGACTCGTGGTACATGC	25

3.1.3 Antikörper

Tab. 3.4 Primäre Antikörper für Immuno-Blotting

Antigen	Host	Verdünnung	Hersteller (Best. Nr.)
p-AKT	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling (4060)
AKT	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling (4691)
β-Actin	Maus	1:10.000	Sigma-Aldrich (A1978)
pERK1/2	Kaninchen	1:1.000	Cell signaling (4370)
ERK1/2	Kaninchen	1:1.000	Cell signaling (4695)
pSTAT1	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling (9167)
STAT1	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling (9175)
pSTAT3	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling (9145)
STAT3	Maus	1:2.000	Cell Signaling (9139)

Tab. 3.5 Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz von Cryoschnitten

Antigen	Host	Verdünnung	Fixierung	Hersteller (Best. Nr.)
CD11b	Ratte	1:200	Aceton-Methanol	BioLegend (101201)
CD11b	Kaninchen	1:200	Aceton-Methanol	Novus Bio (NB-110-89474SS)
CD31	Ratte	1:50	Aceton-Methanol	BD Bioscience
CLEC4F	Ziege	1:250	Aceton-Methanol	R&D Systems (AF2784)
CD11c	Hamster	1:200	Aceton-Methanol	eBioscience/Thermo Fisher Scientific (11-0114)
E-Cadherin	Kaninchen	1:200	Aceton-Methanol	Cell Signaling (3195)
EpCam	Ratte	1:200	Aceton-Methanol	eBioscience (14579181)
Gr-1	Ratte	1:200	Aceton-Methanol	BD Bioscience (550274)
Ki-67	Kaninchen	1:400	Aceton-Methanol	Cell Signaling (12202)
Nephrin	Meerschweinchen	1:50	Aceton-Methanol	Origene (BP5030)
SAA1/2	Ziege	1:80	Aceton-Methanol	R&D Systems (AF2948)
p-STAT3	Kaninchen	1:100	PFA	Cell Signaling (9145)
ZsGreen	Kaninchen	1:100	Aceton-Methanol	Takara/Clontech (632474)

Tab. 3.6 Sekundäre Antikörper

Target	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Hamster	AlexaFluor® 594	1:200	Life Technologies (A21113)
Kaninchen	AlexaFluor® 488	1:200	Life Technologies (A21206)
Meerschweinchen	AlexaFluor® 594	1:200	Life Technologies (A11076)
Ratte	AlexaFluor® 488	1:200	Life Technologies (A21208)
Ratte	AlexaFluor® 594	1:200	Life Technologies (A21209)
Ziege	AlexaFluor® 594	1:200	Life Technologies (A11055)
Maus	Meerrettichperoxidase	1:10.000	Thermo Scientific (31432)
Kaninchen	Meerrettichperoxidase	1:10.000	Danova (111-035-144)
Kaninchen	Meerrettichperoxidase	1:10.000	Dako (K4003)

3.1.4 Mauslinien

Tab. 3.7 Mauslinien

Mauslinie	Bezeichnung	Herkunft
Alb ^{tm1} (Cre/ERT ²) Mtz	Alb- CreERT ² ::ROSA ^{Lgp130/Lgp130}	Daniel Metzger, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, Frankreich
Tg(Vil1- Cre/ERT ²)23Syr	Vil- CreERT ² ::ROSA ^{Lgp130/Lgp130}	Sylvie Robine, Institut Curie, Paris
R26 ^{Lgp130/Lgp130}	R26 ^{Lgp130/Lgp130}	Thomas Wunderlich, MPI, Köln

3.2 Methoden

3.2.1 Tierversuche

3.2.1.1 Haltung

Die Mäuse wurden unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen in einem 12-stündigen Lichtzyklus gehalten. Die Raumtemperatur lag stabil bei 22°C. Die Mäuse wurden ad libitum mit Standard-Laborfutter (Sniff V1534-000, Soest, Germany) gefüttert. Alle Tiere wurden nach den deutschen und europäischen Tierverordnungen behandelt (V242-7224.121-33).

3.2.1.2 Zucht

Mäuse wurden in einem Alter von mindestens 8 Wochen zur Zucht eingesetzt. Während dieser Zeit erhielten sie ein Spezialfutter (Sniff V1124-000, Soest, Germany). Die Nachkommen wurden in einem Alter von 3 Wochen nach der Geburt von der Mutter abgesetzt. Alle verwendeten Mäuse in dieser Studie wurden 6-10 Generationen mit Mäusen mit einem C57BL/6N Hintergrund gekreuzt.

3.2.1.3 Genotypisierung

Zur Genotypisierung wurden Ohrstanzen und Schwanzbiopsien von 3 Wochen alten Mäusen verwendet. Zur Vermeidung von Blutungen, Entzündungen und Kreuzkontaminationen wurde ein Sterilisator mit heißen Perlen und Scheren verwendet. Die Schwanzbiopsien wurden über Nacht in 0,5 mL DNA Isolationspuffer Puffer bei 55°C und 1.000 U/min verdaut. Das

verdaute Material wurde 5 min lang bei 13.000 U/min pelletiert. Im Anschluss wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 170 μ L gesättigter NaCl-Lösung gemischt. Nachdem die Proben 20 min bei 13.000 U/min zentrifugiert wurden, wurde der Überstand erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur DNA-Fällung mit 1 mL 100%igem Ethanol gemischt. Im Anschluss wurde die Probe 5 min lang bei 13.000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 0,5 mL 70%igem Ethanol für 5 min bei 13.000 U/min gewaschen, der Überstand verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur 15 min lang getrocknet. Nachdem das Pellet in 100 μ L TE-Puffer resuspendiert und bei 50°C für 5-20 min vollständig aufgelöst wurde, konnte die DNA entweder bei -20°C gelagert oder direkt für die Genotypisierung von PCRs verwendet werden.

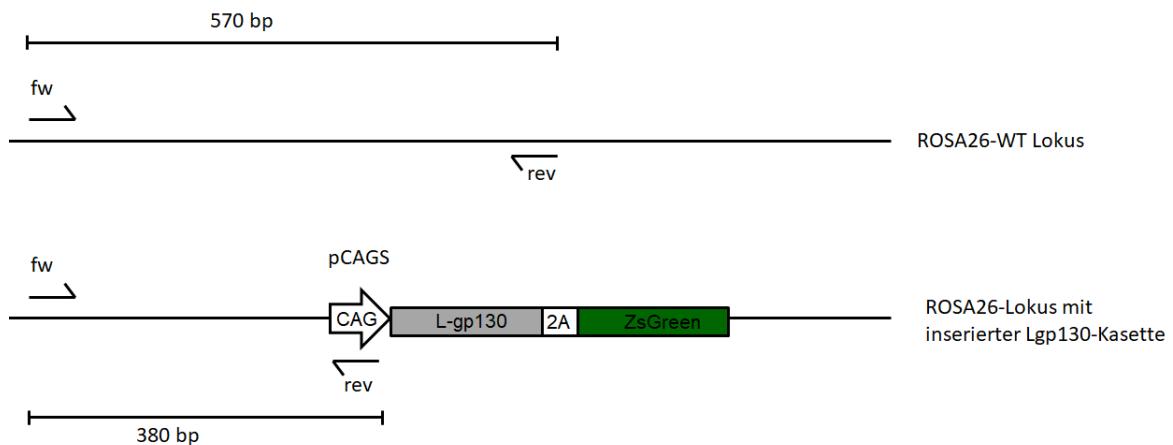


Abb. 3.1: Primerbindung an ROSA26-WT-Lokus und ROSA26-Lokus mit inserierter Lgp130-Kassette. Nicht getargeteter ROSA26-WT-Lokus, an dem forward (fw) und Revers (rev) Primer binden (oben). ROSA26-Lokus mit inserierter Lgp130-Kassette mit gemeinsamen WT fw-Primer und rev-Primer, welcher im CAGS Promoter des Lgp130 Konstrukt bindet (unten).

DNA Isolationspuffer	100 mM	Tris-HCl pH 8,5
	200 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	0,2 %	SDS
	0,3 mg/mL	Proteinase K (direkt vor Benutzung dazugeben)
TE-Puffer	100 mM	Tris-HCl pH 7,5
	10 mM	EDTA

PCR Mix Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130}

1,0 µL DNA
3,0 µL 10x *DreamTaqTM buffer*
3,0 µL dNTPs (2 mM)
1,5 µL 5` Primer (10 µM)
1,5 µL 3` Primer (10 µM)
0,2 µL DreamTaqTM Polymerase
30 µL ddH₂O

Tab. 3.8 Konditionen für Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} PCR

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2	1
Denaturierung	95°C	30	30
Annealing	56°C	30	
Elongation	72°C	30	
Finale Elongation	72°C	10	1
Lagerung	4°C	∞	1

PCR Mix Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130}

1,0 µL DNA
3,0 µL 10x *DreamTaqTM buffer*
3,0 µL dNTPs (2 mM)
1,5 µL 5` Primer (10 µM)
1,5 µL 3` Primer (10 µM)
0,2 µL DreamTaqTM Polymerase
30 µL ddH₂O

Tab. 3.9 Konditionen für Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} PCR

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5	1
Denaturierung	95°C	20	30
Annealing	56°C	15	
Elongation	72°C	20	
Finale Elongation	72°C	10	1
Lagerung	4°C	∞	1

PCR Mix R26^{Lgp130/Lg130} 1,0 µL DNA

3,0 µL 10x *DreamTaqTM buffer*
3,0 µL dNTPs (2 mM)
1,5 µL 5` Primer (10 µM)
1,5 µL 3` Primer (10 µM)
0,2 µL DreamTaqTM Polymerase
30 µL ddH₂O

Tab. 3.10 Konditionen für R26^{Lgp130/Lg130} PCR

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	3	1
Denaturierung	95°C	30	40
Annealing	56°C	30	
Elongation	72°C	30	
Finale Elongation	72°C	10	1
Lagerung	4°C	∞	1

3.2.1.4 DSS-Kolitis Mausmodell

Zur Untersuchung einer akuten entzündlichen Darmerkrankung wurde das etablierte DSS- (Dextran-Sodium-Sulfat) Mausmodell verwendet [223].

Die Mäuse wurden in einem Alter von 8-10 Wochen an vier aufeinanderfolgenden Tagen zur Aktivierung des CreERT² Fusionsprotein i.p. mit Tamoxifen injiziert. Nach 7 Tagen bekamen die Mäuse 5 Tage 2 % (w/v) DSS gelöst in Trinkwasser ad libitum, gefolgt von 5 Tagen normalen Trinkwasser. Während dieser Dauer wurden die Mäuse täglich kontrolliert und gewogen. Der Kot der Mäuse wurde nach dem DSS-Zyklus mit dem Guajak-basierten Haemoccult®-Test von Beckman Coulter (USA) auf okkultes Blut kontrolliert. Die Experimente wurden mit der Referenznummer V242-7224.121-33 bei der Genehmigungsbehörde genehmigt.

3.2.1.5 AOM/DSS-Kolitis Mausmodell

Zur Untersuchung der Entwicklung von Kolitis-assoziiertem Darmkrebs in Verbindung mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde das etablierte Azoxymethan (AOM)/DSS-Kolitis Mausmodell verwendet [218, 219].

Hierbei wurden Mäuse im Alter von 8-12 Wochen an vier aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen i.p. injiziert. Zur Induktion der Tumorbildung wurde den Mäusen 7 Tage nach der letzten Tamoxifen-Injektion einmalig 10mg/Kg Körpergewicht AOM i.p. injiziert, um DNA-Schäden in Darmepithelzellen zu induzieren. Gleichzeitig bekamen die Mäuse für jeweils 7 Tage 1% (w/v) DSS in Trinkwasser gelöst ad libitum, gefolgt von 14 Tagen normalem Trinkwasser zur Förderung der chronischen Entzündung im Dickdarm. Dieser Zyklus wurde

insgesamt dreimal durchgeführt. In den ersten 14 Tagen des Zyklus wurden die Mäuse täglich kontrolliert und gewogen, im Anschluss einmal wöchentlich, da ein Gewichtsverlust von mehr als 25 % ein definiertes Abbruchkriterium darstellte. Zusätzlich wurde der Kot der Mäuse nach jedem DSS-Zyklus mit dem Guajak-basierten Haemoccult®-Test von Beckman Coulter (USA) auf okkultes Blut kontrolliert. Die Experimente wurden mit der Referenznummer V242-7224.121-33 bei der Genehmigungsbehörde genehmigt.

3.2.1.6 Organ – und Blutentnahme

Die Mäuse wurden gemäß den Tierschutzrichtlinien durch zervikale Dislokation getötet. Der Brustkorb wurde geöffnet und Blut aus dem Herzen entnommen. Dieses wurde in Mikroröhrchen mit Lithium-Heparin (25 I. E. Heparin/mL Blut) überführt und bei Raumtemperatur für 10 min bei 2.000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Plasma in frische Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Nach der Perfusion mit eiskaltem PBS wurde die Leber entnommen, gewogen und für die weitere Verwendung aufbereitet. Der Dünndarm und der Dickdarm wurden entfernt und mit eiskaltem PBS durchgespült um Kot Reste zu entfernen. Anschließend wurden die Därme in Längsrichtung geöffnet.

3.2.1.7 Histologie

Zur histologischen Analyse ist es notwendig die Darmmorphologie und Krypten- bzw. Villusarchitektur unbeschadet zu lassen. Hierzu wurde der Darm schonend seziert und in einer Petrischale mit eiskaltem PBS auf Eis gelagert. Im nächsten Schritt wurden der Magen vom Duodenum, sowie das Ileum vom Zäkum getrennt um den gesamten Dünndarm zu erhalten. Im Anschluss wurde der Übergang vom Zäkum und Dickdarm getrennt um den gesamten Dickdarm zu erhalten. Zur Entfernung von Verdauungsenzymen und Fäkalien wurden sowohl der Dünnd- als auch der Dickdarm mit eiskaltem PBS gespült. Anschließend wurden Pankreas, Mesenterium, Fett und Blutgefäße von der Darmoberfläche entfernt und der Dünnd- und Dickdarm in Längsrichtung geöffnet. Zur makroskopischen Analyse wurden die Därme mit einem Nikon AZ100 Mikroskop aufgenommen und mit der NIS-Elements D 4.12.01 Software analysiert. Im Anschluss wurde der gereinigte Darm mit Hilfe einer Pinzette von cranial zu caudal zu einer „Swiss roll“ aufgerollt [224].

3.2.1.8 Immunhistochemie

Nachdem der Dünndarm und der Dickdarm in eine Einbettkassette gelegt wurden, folgte über Nacht eine Fixierung in einer Carnoy-Lösung bei 4°C. Im Anschluss wurden die Gewebe durch die aufsteigende Alkoholreihe und einer Xylol-Inkubation wie unten aufgeführt dehydriert.

Carnoy-Lösung	300 mL	EtOH
	150 mL	Chloroform
	50 mL	Essigsäure
Dehydration	60 min	70 % Ethanol
	30 min	96 % Ethanol I
	60 min	96 % Ethanol II
	90 min	100 % Ethanol I
	120 min	100 % Ethanol II
	90 min	Xylol I
	90 min	Xylol II
	30 min	Paraffin I
	ü. N.	Paraffin II
	30 min	Paraffin III

Die Gewebe wurden in Paraffin eingebettet, in 10 µm dicke Schnitte geschnitten und bei RT gelagert.

3.2.1.9 Histologische Färbungen

Die Gewebeschnitte wurden nach Standardverfahren mit Hämatoxylin-Eosin (HE) oder *Periocidic Acid-Schiff* (PAS) gefärbt. Hierfür mussten die Gewebeschnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert werden (s. unten).

Rehydrierung	5 min	Xylol III
	5 min	Xylol II
	5 min	Xylol I
	5 min	100 % Ethanol II
	5 min	100 % Ethanol I
	5 min	96 % Ethanol II
	5 min	96 % Ethanol I
	5 min	70 % Ethanol II
	5 min	70 % Ethanol I
	5 min	30 % Ethanol
	5 min	ddH ₂ O

Bei der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung wird Hämatoxylin als basischer Farbstoff verwendet, welcher Säurestrukturen wie DNA im Zellkern oder RNA in Ribosomen violett anfärbt, während Eosin als saurer Farbstoff acidophile Strukturen wie basische Proteine im Zytoplasma rosa färbt. Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Gewebeschnitte 10 min in handelsübliche Hämatoxylin-Lösung nach Mayer inkubiert und anschließend für 10 min mit ddH₂O gewaschen. Im Anschluss erfolgte für 2 min die Inkubation in handelsübliche Eosin-Lösung. Nach mehrmaligem Waschen mit ddH₂O, aufsteigender Alkoholreihe und Xylol-Inkubation wurden die Gewebeschnitte mittels Histokitt II versiegelt.

Bei der *Periocidic Acid-Schiff* (PAS)-Färbung werden Kohlenhydrat-Makromoleküle magenta angefärbt. Im Darm sind diese äquivalent zu Becherzellen, welche Mucin produzieren. Nach

der Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Gewebeschnitte 15 min in 0,5%iger Perjodsäure oxidiert und anschließend mit ddH₂O gewaschen. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte für 15 min in handelsüblichem Schiff-Reagenz inkubiert und anschließend mit ddH₂O gewaschen. Danach folgte die Gegenfärbung für 10 min mit handelsüblicher Hämatoxylin-Färbelösung nach Mayer. Nach mehrmaligem Waschen mit ddH₂O, aufsteigender Alkoholreihe und Xylol-Inkubation wurden die Gewebeschnitte mittels Histokitt II versiegelt.

Die Gewebeschnitte wurden mit einem Hamamatsu NanoZoomer Digital Slide Scanner aufgenommen und Kryptenlängen und Becherzellen auf dem gesamten Schnitt wurden mit Hamamatsu NDP.view 2 Image viewing Software (Version 2.9.29) quantifiziert.

3.2.1.10 Gewebe-Kryokonservierung

Die Leber wurde mit eiskaltem PBS perfundiert und im Anschluss in der Mitte einer Tissue-Tek® Cryomold® (Sakura, Deutschland) platziert. Danach wurde das Gewebe mit Tissue-Tek® O. C. T. TM (Sakura, Deutschland) umgeben und das Tissue-Tek® Cryomold® (Sakura, Deutschland) mit dem umschlossenen Lebergewebe zum Einfrieren auf Trockeneis gestellt. Der Gewebeblock wurde im Anschluss bei -80°C gelagert.

Der Dünndarm und der Dickdarm wurden vom proximalen Ende mit eiskaltem PBS gespült und in Längsrichtung geöffnet. Die Därme wurden zu einer „Swiss role“ in nassem Kimwipe™ aufgerollt und danach für 3 Stunden in 4% PFA bei 4°C fixiert. Nach Entfernung der Kimwipe™ wurde die „Swiss role“ über Nacht in 30 % Sucrose in 1 x PBS transferiert. Am nächsten Tag wurde der Darm auf einer Glasplatte ausgebreitet und TissueTek® O.C.T.™ (Sakura, Deutschland) auf der Geweboberfläche hinzugefügt, um Kristallisierungen von Wasser zu verhindern. Im Anschluss wurde der Darm wieder zu einer „Swiss roll“ [224] aufgerollt und in der Mitte einer Tissue-Tek® Cryomold® (Sakura, Deutschland) platziert und mit Tissue-Tek® O. C. T. TM (Sakura, Deutschland) umgeben. Im Anschluss wurde die Tissue-Tek® Cryomold® (Sakura, Deutschland) auf Trockeneis gestellt und das Gewebe somit eingefroren. Die Gewebeblöcke wurden bei – 80°C gelagert.

3.2.1.11 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe des Kryostaten CM 3050S (Leica Mirkosystems, Nussloch, Deutschland) wurden 8 µm dicke Leberschnitte angefertigt und bei -80°C gelagert. Die Schnitte wurden in Aceton-Methanol (v/v) für 2 min fixiert und anschließend dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Gewebe mit einem Wachsstift (Dako, Deutschland) umkreist, mit Protein Block, Serum-Free (Dako, Deutschland) blockiert und über Nacht bei 4°C mit 90 µl des Primärantikörpers in einer Feuchtkammer inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und im Anschluss für 30 min mit dem Fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörper bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden nochmals dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und im Anschluss mit DAPI, gelöst in Mowiol-Dabco, versiegelt. Gewebeschnitte wurden mit dem Konfokalmikroskop ZEISS LSM 810 aufgenommen. Ki67⁺-Zellen auf dem gesamten Schnitt wurden mittels ImageJ (Version 1.53) quantifiziert. SAA2-positive Färbungen wurden mit Color Threshold als Schwellenwertfarbe markiert und mittels *area quantification* in ImageJ quantifiziert.

Mowiol-DABCO-DAPI-Lösung	3,25 M	Mowiol
	3,24 M	Glycerol
	6,0 mL	ddH ₂ O
	60%	0,2 M Tris-Cl-Lösung (pH 8,5)
	223 mM	DABCO
	1:1.000	DAPI (1mg/mL)

3.2.1.12 Immunfluoreszenz nach TSA

Für die Immunfluoreszenz-Färbung von pSTAT3 wurde das *tyramide signal amplification* (TSA) System verwendet (TSATM Plus Cyanine 3 System, PerkinElmer, Massachusetts, USA NEL744001KT). Hierbei wird durch enzymgekoppelte Signalverstärkung eine bis zu 100-fach erhöhte Sensitivität im Gegensatz zu Standardnachweismethoden erreicht [225]. Lebergewebe wurde wie in 3.2.1.10 präpariert. Die Schnitte wurden für 15 min bei RT in einer 3%-igen Paraformaldehyd-Lösung in PBS inkubiert und anschließend für 5 min in eisgekühltem Methanol (-20°C) inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte zweimal für

5 min in TBS gewaschen, zur Blockierung der endogenen Peroxidase für 10 min bei RT in 3% H₂O₂ in Methanol inkubiert und zweimal für 5 min mit TBS gewaschen. Anschließend wurden die Gewebe mit einem Wachsstift (Dako, Deutschland) umkreist, mit Protein Block, Serum-Free (Dako, Deutschland) blockiert und über Nacht bei 4°C mit 90 µl des pSTAT3-Antikörpers in einer Feuchtkammer inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte dreimal für 5 min mit TBS gewaschen und im Anschluss für 30 min mit dem sekundären Antikörper Envision-HRP-Polymer anti-Kaninchen inkubiert. Nachdem die Schnitte nochmals dreimal für 5 min mit TBS gewaschen wurden, wurden sie mit 50 µl TSA-Lösung für 5 min bei RT inkubiert und im Anschluss für 5 min mit TBS gewaschen. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Danach wurden die Schnitte mit DAPI, gelöst in Mowiol-Dabco, versiegelt. Gewebeschnitte wurden mit dem Konfokalmikroskop ZEISS LSM 810 aufgenommen.

TBS	137 mM	NaCl
	2,68 mM	KCl
	2,48 mM	Tris
pH 7,4 einstellen		

3.2.1.13 RNA Isolation

Die Gesamt-RNA wurde aus 25 mg Leber- bzw. Dünn- oder Dickdarmproben unter der Verwendung von NucleoZOL (Macherey-Nagel, 740404.200) isoliert. NucleoZOL bietet eine Einphasenextraktion, was die Kontamination minimiert. Es besteht aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat und lysiert und homogenisiert das Gewebe. Zur Isolation der Gesamt-RNA wurden je 1 mL NucleoZOL und vier bis sechs 1,4 mm Zirconium Beads (OPS Diagnostics, Lebanon, USA) dem Gewebe hinzugefügt und mittels Cryolys Precellys 24 Gewebehomogenisator (Bertin, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich) bei 4°C und 5.400 rpm für zwei Mal 30 Sekunden lysiert. Die homogenisierte Probe wurde im Anschluss für 5 min bei RT inkubiert. Nach einer Zugabe von 200 µL Chloroform wurde die Probe für 15 s geschüttelt, danach für 2 min bei RT inkubiert und anschließend für 15 min bei 4°C bei 12.000 rpm zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen, wobei sich die isolierte RNA in der oberen wässrigen Phase befand. Diese wurde in ein „Non-Stick RNase-free Microfuge Tubes“ (Ambion, AM12450) transferiert und 500 µL Isopropanol je Probe hinzugefügt. Im Anschluss

wurden die Proben dreimal invertiert und über Nacht bei -20°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 10 min bei 4°C und 12.000 rpm zentrifugiert und die entstandenen Überstände entfernt. Das RNA-Pellet wurde mit 1 mL 75%-igem Ethanol gewaschen und anschließend bei 7.500 rpm und für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Nach Entfernung des Ethanol wurde das RNA-Pellet in 400 µL DEPC-behandeltes ddH₂O gelöst und für 10 min bei 60°C inkubiert. „MaXtract High Density“-Reaktionsgefäß (Qiagen, 129046) wurden für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um das darin enthaltene Gel zu pelletieren. Im Anschluss wurden jeweils 200 µL Phenol und 200 µL Chloroform zur gelösten RNA hinzugegeben, für 5 s resuspendiert und in die „MaXtract High Density“-Reaktionsgefäß überführt. Diese wurden für 2 min bei 13.000 rpm bei 4°C zentrifugiert und die obere wässrige Phase, welche die RNA enthielt, wurde in ein neues „Non-Stick RNase-free Microfuge Tube“ transferiert. Der Probe wurde erneut Phenol und Chloroform hinzugefügt und in einem neuen „MaXtract High Density“-Reaktionsgefäß zentrifugiert. Nachdem die obere wässrige Phase erneut in ein neues „Non-Stick RNase-free Microfuge Tube“ transferiert wurde, wurden 40 µL 3 M Natriumacetat und 352 µL Isopropanol hinzugefügt, die Proben für 5 min resuspendiert und über Nacht bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 13.000 rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand im Anschluss entfernt. Das RNA-Pellet wurde mit 100 mL eiskaltem 75%-iger Ethanol gewaschen und für 5 min bei 9.500 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt, das Pellet nochmals gewaschen und der Überstand erneut entfernt. Das RNA-Pellet wurde im Anschluss für 5-10 min bei RT an der Luft getrocknet. Anschließend wurden 100 µL DEPC-behandeltes ddH₂O hinzugefügt, bei 60°C für 5 min inkubiert und resuspendiert. Im Anschluss wurde die RNA-Konzentrationen mittels NanoDrop-1000 (Thermo Scientific, Sankt Leon-Rot, Deutschland) ermittelt. Die entstandene RNA wurde bei -20°C gelagert oder direkt in cDNA transkribiert.

3.2.1.14 cDNA Synthese

Die isolierte RNA wurde mittels RevertAid™ Reverse Transcriptase (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) zu cDNA transkribiert.

cDNA PCR Mix	1,0 µg	RNA
	2,0 µL	oligo(dT) ₁₈ primer
	3,0 µL	10x Reaktionspuffer
	2,0 µL	dNTPs (10 mM)
	1,0 µL	RevertAid™ Reverse Transcriptase
		DEPC-behandeltes H ₂ O ad 20 µL

Der cDNA PCR Mix wurde für 60 min bei 42°C und im Anschluss für 10 min bei 70°C inkubiert. Die entstandene cDNA wurde im Folgenden für die quantitative Real-Time PCR verwendet oder bei -20°C gelagert.

3.2.1.15 Quantitative Real-Time PCR

Die cDNA wurde mit Hilfe eines Roche Light Cycler 480 II analysiert. Hierbei wurden Primer und die dazugehörigen UPL Proben aus Tab. 3.3 verwendet.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Proteinlysate

Murines Lebergewebe sowie Darmgewebe wurden mit Hilfe von Keramikkügelchen in 10 µL RIPA Puffer pro mg Gewebe mechanisch in einem Homogenisator bei 550 rpm für 3 min bei 4°C zerstört (Precellys ® mit Cryolys-Kühlmodul, Peqlab, Erlangen, Deutschland). Zelldebris wurden im Anschluss für 10 min bei 4°C und 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Proteinlysate wurden kurzzeitig bei -20°C und langfristig bei -80°C gelagert.

RIPA Puffer	50 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	0,1 %	SDS
	0,3 %	Natriumdesoxycholat
	1 %	Triton X-100

Frisch dazugeben	1 mM	PMSF
	1 mM	NaV
	1,46 µM	Pepstatin A
	1,54 µM	Aportinin
	2,1 µM	Leupeptin

5x Laemmli Puffer	250 mM	Tris-HCl pH 6.8
	10 %	SDS
	50 %	Glycerine
	5 %	β-Mercaptoethanol

3.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Proteinlysaten von kultivierten Zellen oder murinen Geweben wurde die BCA-Methode verwendet. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstelleranweisungen analysiert.

3.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinexpression wurde mittels Immunoblot-Analyse untersucht. Hierzu wurden zunächst die Lysate mit 5x Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Im Anschluss wurden 100 µg Protein mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierzu wurde ein 10% Bis-Tris Trenngel vorbereitet und nach erfolgter Polymerisation mit einem Sammelgel überlagert. Zusätzlich wurde hierbei ein Kamm mit 10-15 Taschen in das Sammelgel eingelassen. Das Gel wurde im Folgenden in die Elektrophorese Kammer eingefügt und die Kammer mit Laufpuffer aufgefüllt. Nach Entfernen des Kamms wurden die denaturierten Proben, sowie 5 µL *PageRulerTM Prestained Plus Protein Marker* in die Taschen geladen. Die Gelelektrophorese wurde im Anschluss bei 100V für 90-120 min durchgeführt.

Trenngel	10 %	Acrylamide
	350 mM	bis-Tris pH6.5
	0,1%	SDS
	0,1 %	APS
	0,06 %	TEMED

Sammelgel	4 %	Acrylamide
	350 mM	bis-Tris pH6.5
	0,1%	SDS
	0,1 %	APS
	0,06 %	TEMED

Laufpuffer	250 mM	MOPS
	250 mM	Tris
	5 mM	EDTA
	0,5 %	SDS
	5 mM	Sodium bisulfite

3.2.2.4 Immuno-Blotting

Nach der Proteinseparation durch SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid Membran (PVDF) übertragen. Hierzu wurde das Trenngel auf einem Schwamm und 3 Whatmann-Papieren platziert. Im Folgenden wurde eine PVDF Membran zur Aktivierung für 2 min mit Methanol bedeckt, im Anschluss kurz in Transferpuffer inkubiert und nachfolgend auf das Gel gelegt. Dies wurde mit 3 weiteren Whatmann-Papieren und einem Schwamm überdeckt. Nachfolgend wurde der zusammengesetzte Immuno-Blot zusammen mit einer Eispackung in die Blotting Kammer gestellt und der Proteintransfer für 90 min bei 100 V durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran für 1 h bei RT in 5 % BSA in PBS-T blockiert und im Anschluss über Nacht im primären Antikörper (Tab. 3.4) bei 4°C inkubiert.

Primärantikörperverdünnung in PBS-T

5 %	BSA
0,02 %	Natriumazid
5 mM	EDTA

Am nachfolgenden Tag wurde die Membran dreimal für 5 min in PBS-T gewaschen, um nicht spezifisch gebundene Antikörper wegzuwaschen. Im Anschluss wurde die Membran mit sekundärem HRP-gekoppelten Antikörper verdünnt in einer 5 % BSA-PBS-T Lösung für 1 h inkubiert und nachfolgend nochmals dreimal mit PBS-T und einmal mit ddH₂O gewaschen. Zur Signalerkennung wurde SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate oder SuperSignal™ West Pico Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany) nach Herstelleranweisungen verwendet. Die Aufnahmen wurden im Dunkeln mit dem Intas Chemocam Imager ECL (Intas, Hamburg, Germany) mit einer individuellen Belichtungszeit von 0,5 bis 5 min aufgenommen.

Transfer Puffer	25 mM	Tris
	200 mM	Glycine
	20 %	Methanol

PBS-T	136 mM	NaCl
	2,68 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,76 mM	KH ₂ PO ₄
	pH 7,4 einstellen	
	0,05 % Tween-20 hinzufügen	

3.2.2.5 Strippen des Immuno-Blots

Beim Strippen des Immuno-Blots wurde der Primär- und Sekundärantikörper von der Membran entfernt, sodass mehrere Antikörper analysiert werden konnten. Zum Strippen des Immuno-Blots wurde die Membran zweimal für 15 min in Stripping Puffer bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal für 10 min bei RT in PBS und im Anschluss zweimal für 5 min in PBS-T gewaschen. Nachfolgend wurde die Membranen in 5 % BSA in PBS-T für 1 h bei RT blockiert und im Anschluss mit einem primären Antikörper über Nacht bei 4°C erneut inkubiert.

Stripping Puffer	200 mM	Glycine
	3,47 mM	SDS
	1 %	Tween-20
	pH 2,2 einstellen	

3.2.2.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISAs zur Detektion von SAA1 (#MSAA00, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) und CXCL1 (#DY453, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland in murinen Plasmaproben wurden nach Herstelleranweisungen durchgeführt.

3.2.2.7 Multiplex-Assay

Zur Detektion der murinen Zytokine IL-1 β (#740157), IL-6 (#740159), IL-10 (#740158), IL-17A (#740161) und IL-23 (#740151) im Serum und Darm wurde das LEGENDplexTM Mouse Inflammation Panel von BioLegend (San Diego, Kalifornien, USA) nach Herstelleranweisungen durchgeführt. Das Darmgewebe wurden wie in 3.2.2.1 beschrieben lysiert.

3.2.3 Statistik

Die Daten in allen Graphen wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Normalverteilung wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk Normalitäts-Test ermittelt. Beim Vergleich von zwei Gruppen mit Normalverteilung und gleichen Varianzen wurde der Student's t-test durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Gruppen wurde der Mann-Whitney-U Test angewendet. Mehr als zwei Gruppen wurden bei Normalverteilung und gleichen Varianzen mit einem ANOVA-Test und anschließendem Tukey Post-hoc-Test verglichen. Nichtnormalverteilte Gruppen und Gruppen mit Normalverteilung, welche jedoch unterschiedlichen Varianzen aufwiesen, wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test verglichen. Die Ergebnisse wurden mit GraphPad PRISM 7 (GraphPad software, Inc., Kalifornien, USA) ausgewertet. Hierbei wurde ein $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen ($p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,001$ ***).

4 Ergebnisse

Verschiedene hepatische Zelltypen wie Hepatozyten, Cholangiozyten, hepatische Sternzellen, Kupffer-Zellen und Endothelzellen exprimieren den membrangebundenen IL-6Ra und können daher direkt auf IL-6 ansprechen [226, 227]. Es ist daher schwer, den biologischen Effekt von IL-6 einem einzelnen Zelltyp zuzuordnen. Aus diesem Grund wurde in unserem Labor eine konstitutiv aktive Variante von gp130 zur ligandenunabhängigen gp130-Aktivierung erzeugt. Diese kann mittels Expressionskassette Cre-abhängig in selektierten Zelltypen induziert werden. Somit ist die Analyse zelltyp-spezifischer gp130 Signale möglich [98]. Mit Hilfe dieser konnten wir Signalübertragungen in ausgewählten Zelltypen der Leber und dem Darm aktivieren, um die Auswirkungen zellautonomer- und zelltypspezifischer gp130 Signalübertragungen bei der Leber- und Darmentzündung und Tumorbildung zu analysieren.

4.1 Zellautonome gp130 Aktivierung in Hepatozyten im Mausmodell

Zur Analyse zellautonomer Lgp130 Expression in Hepatozyten induzierten wir Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse im Alter von 6 Wochen an vier aufeinander folgenden Tagen mit Tamoxifen (TAM) oder Ethanol/Öl und analysierten diese nach 2, 3, 4 oder 60 Wochen (Abb. 4.1A). Zum Ausschluss von unspezifischen Effekten von Tamoxifen wurden Cre-negative Kontrollmäuse in die Analysen eingeschlossen, welche ebenfalls mit Tamoxifen injiziert wurden. Die Tamoxifen-induzierten Mäuse zeigten ein signifikant erhöhtes Transkriptionsniveau von *lgp130* in der Gesamtleber-RNA (Abb. 4.1B), wohingegen dies in den Kontrollgruppen fehlte. Immunfluoreszenz-Analysen zeigten eine Hepatozyten-spezifische Färbung und homogene Expression des ZsGreen Reporterkonstrukts (Abb. 4.1C). Lgp130 Expression in Hepatozyten führte zu einer erhöhten STAT3 Phosphorylierung, die in Schnitten von Kontrolltieren nicht zu detektieren war (Abb. 4.1D). Diese konnte ebenso im Immunoblot nachgewiesen werden. Interessanterweise beobachteten wir eine reduzierte ERK1/2 Phosphorylierung nach Lgp130-Expression. Dieser Befund deckt sich mit Beobachtungen, dass aktivierende Patienten-assoziierte gp130-Mutationen ebenfalls zu einer Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung führten [50]. Darüber hinaus konnte keine STAT1- oder AKT-Phosphorylierung nach Lgp130-Expression nachgewiesen werden (Abb. 4.1E). Obwohl die Expression von *Socs3* in den Tamoxifen-induzierten Mäusen signifikant hochreguliert war (Abb. 4.1F), was zu einer negativen Rückkopplung führt, scheint dies keine Abschwächung des Lgp130-induzierten Signalweges hervorzurufen. Zusammengefasst stellen

Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse ein geeignetes Modell zur Analyse zellautonomer- und zelltypspezifischer Aktivierung von gp130 in Hepatozyten dar.

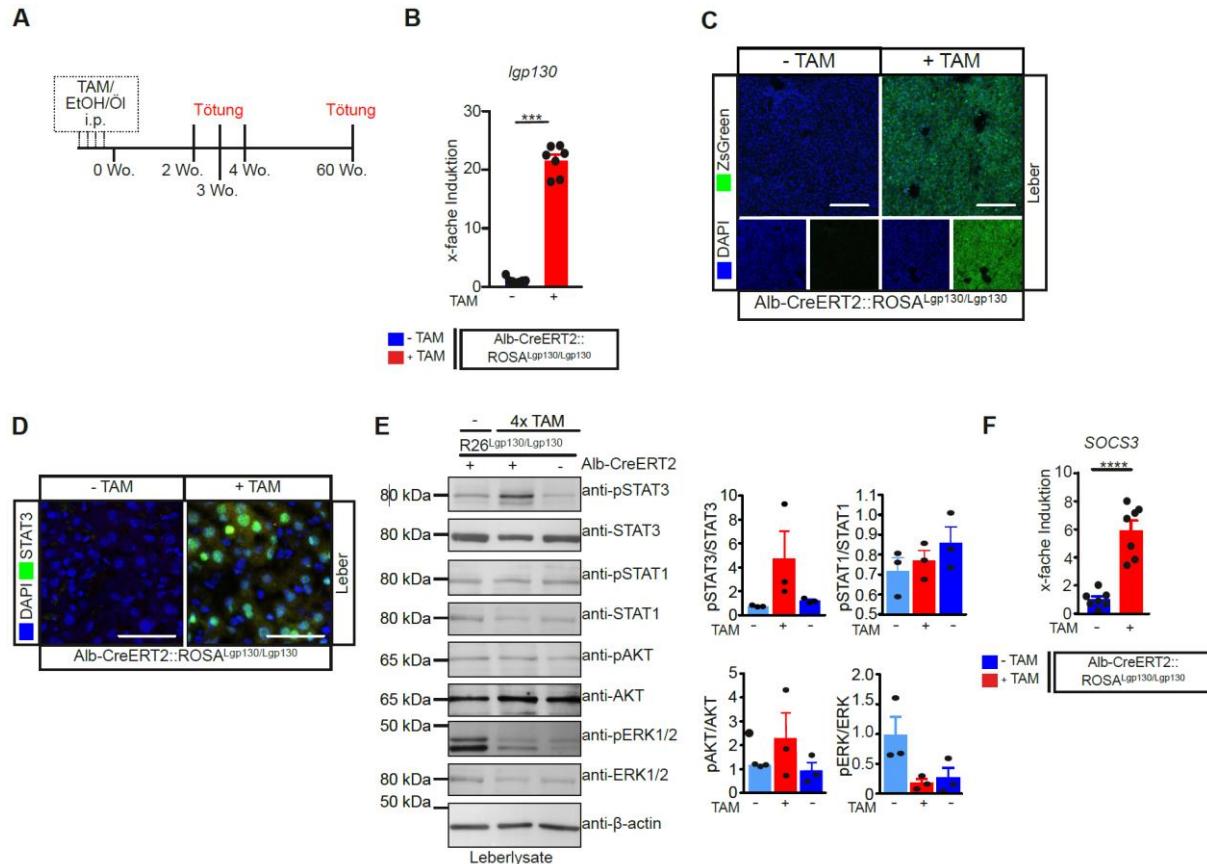


Abb. 4.1: Zellautonome gp130 Aktivierung in Hepatozyten. (A) Versuchsdurchführung für B-F. (B) qRT-PCR der Gesamtleber-RNA zeigte erhöhte *lgp130*-Expression bei Lgp130-Aktivierung. (C) Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbungen zeigten eine ZsGreen Expression in Hepatozyten. (D) Repräsentative Immunfluoreszenz Färbungen wiesen Zelltypspezifische STAT3 Phosphorylierung in Hepatozyten auf. (E) Repräsentativer Immunoblot zeigt erhöhte STAT3 Phosphorylierung jedoch reduzierte ERK1/2 Phosphorylierung in Leber von Tamoxifen-induzierten Mäusen. Abgebildet ist ein repräsentativer Immunoblot und die Quantifizierung von 3 Mäusen / Gruppe. (F) Starke Expression von *SoCs3* in Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Expression. Maßstabsbalken zeigen 100 µm (C) und 25 µm (D). Daten sind Mittelwerte ± SEM. n = 5-7 Mäuse / Gruppe (B). n = 3 unabhängige Experimente (E). n = 7 Mäuse / Gruppe. *** p < 0,0001, *** p < 0,001. Mann-Whitney-U Test (B). Kruskal-Wallis Test (E). Student's t-Test (F).

4.2 Hepatozyten-spezifische gp130/STAT3 Aktivierung ist ausreichend zur Induktion der Akut-Phase-Reaktion

Zur spezifischen Analyse der Lgp130 Expression in Hepatozyten isolierten wir in Kooperation mit Antonella Carambia (UKE) primäre Hepatozyten aus Tamoxifen-induzierten Mäusen und Kontrollmäusen und analysierten diese nach 48 h. Zusätzlich wurden Kontroll-Hepatozyten 24 h nach Isolation mit IL-6 stimuliert und nach 24 h Stimulation analysiert (Abb. 4.2A). Die isolierten Hepatozyten von Tamoxifen-induzierten Mäusen wiesen keine morphologischen Veränderungen auf, zeigten jedoch eine Hepatozyten-spezifische Expression des ZsGreen Reporter-Konstrukts (Abb. 4.2B). Primäre Hepatozyten von Tamoxifen-induzierten Mäusen wiesen ein signifikant erhöhtes Transkriptsniveau von *lgp130* auf (Abb. 4.2C). Transkriptom Analysen von RNA aus isolierten Lgp130-exprimierenden primären Hepatozyten, IL-6 stimulierten primären Hepatozyten und Kontrollhepatozyten ergaben eine erhöhte Expression der Akut-Phase-Gene *Saa1*, *Saa2*, *Serum Amyloid P* (*Apc*s) und *Complement C3* (*C3*), jedoch nicht von *Hpt* (Daten nicht gezeigt) nach hepatozytenspezifischer gp130 Aktivierung und IL-6 Stimulation. Analysen mittels qPCR zeigten eine signifikante Induktion von *Saa1*, *Saa2* in primären Hepatozyten aus Tamoxifen-induzierten Mäusen im Vergleich zu IL-6 stimulierten primären Hepatozyten und Kontrollhepatozyten. *Serum Amyloid P* (*Apc*s) war sowohl in primären Lgp130-exprimierenden Hepatozyten, als auch in IL-6 stimulierten primären Hepatozyten signifikant hochreguliert. Zusätzlich waren Gene, welche hauptsächlich an der Aktivierung der angeborenen Immunantwort beteiligt sind wie *Complement C3* (*C3*), *Proteoglycan 4* (*Prg4*), *IL-17 Rezeptoruntereinheit A* (*IL-17Ra*) und *C-X-C motif chemokine 1* (*CXCL1*) in isolierten Lgp130-exprimierenden primären Hepatozyten signifikant hochreguliert. Dies konnte jedoch nicht für IL-6 stimulierte primäre Hepatozyten aufgezeigt werden. Lediglich eine Hochregulierung von *CXCL1* konnte nachgewiesen werden, wobei dieses in IL-6 stimulierten primären Hepatozyten stärker induziert war, als in Lgp130-exprimierenden primären Hepatozyten (Abb. 4.2D). Gene wie *Albumin*, *Serpin Family A Member 1* (*SerpinA1*) und *Fatty Acid-Binding Protein 1* (*Fabp1*) waren in isolierten Lgp130-exprimierenden primären Hepatozyten signifikant herabreguliert, wobei diese Herabregulierung signifikant stärker war als in IL-6 stimulierten primären Hepatozyten (Abb. 4.2E). Im Überstand von Lgp-130 exprimierenden Hepatozyten konnte eine signifikant erhöhte Proteinmenge an SAA1/2 nachgewiesen werden, wohingegen dies bei IL-6 stimulierten primären Hepatozyten die Proteinmenge von SAA1/2 unverändert war. CXCL1 im Überstand war sowohl bei Lgp130-exprimierenden, als auch bei IL-6 stimulierten Hepatozyten unverändert. Die Konzentration

von CXCL1 war jedoch so niedrig, dass dies nicht auf eine Induktion schließen lässt (Abb. 4.2F).

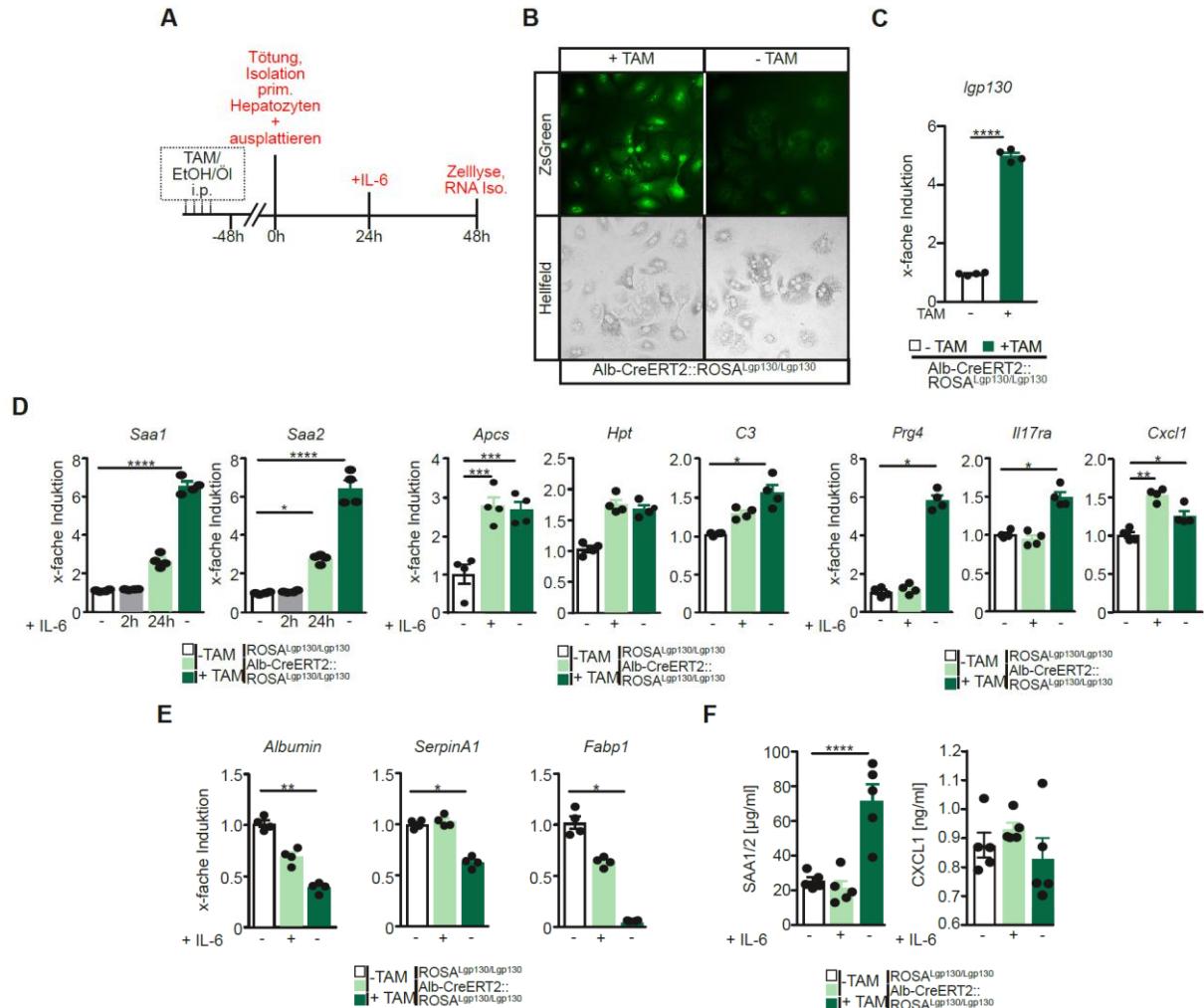


Abb. 4.2: Zellautonome Genregulation nach gp130 Aktivierung in Hepatozyten.
(A) Versuchsdurchführung für B-F **(B)** Fluoreszenz- und Hellfeldmikroskopie zeigten erfolgreiche Expression der ZsGreen-Expressionskassette, jedoch keine morphologischen Veränderungen in Lgp130 exprimierenden Hepatozyten. **(C)** qRT-PCR bestätigte eine erhöhte Lgp130 Expression in primären Hepatozyten. **(D)** qRT-PCR zeigte eine erhöhte Expression der angegebenen Gene der Akutphase und der angeborenen Immunantwort in Lgp130-exprimierenden Hepatozyten. **(E)** Die angegebenen Gene wurden herunterreguliert in Lgp130-exprimierten Hepatozyten. **(F)** ELISA zeigte eine Erhöhung von SAA1/2 im Überstand von Lgp130 induzierten primären Hepatozyten, jedoch nicht durch IL-6 Stimulation. CXCL1 war nicht erhöht im Überstand. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. n=4 unabhängige Experimente (B-F). * p <0,05, *** p <0,001, **** p <0,0001. Einseitige ANOVA mit Tukey's post hoc Test (C-F).

Akut-Phase-Proteine werden bei lokalen und systemischen Störungen wie Infektionen, Gewebeschäden, Traumata, Tumorwachstum und immunologischen Störungen in der Leber produziert und sekretiert. Vorherige Studien zeigten, dass Hepatozyten für die Synthese von Akut-Phase-Proteinen verantwortlich sind [121].

Mäuse mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression zeigten signifikante erhöhte Transkriptwerte in Total-RNA aus der Leber von *Saa1*, *Saa2*, *Hpt* und *ApCs* (Abb. 4.3A), was auf eine Induktion von Akut-Phase-Genen durch hepatozytischen gp130 Signalwegen hinweist. Aufgrund der starken Regulierung der Akut-Phase-Proteine SAA1 und SAA2 wurden diese im Nachfolgenden genauer analysiert. In der Immunfluoreszenz zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression und gleichmäßige Verteilung von SAA1/2 über das gesamte Leberparenchym bei Lgp130 exprimierenden Mäusen (Abb. 4.3B). Dies korrelierte direkt mit der gleichmäßigen Verteilung und Expression des ZsGreen-Reporterkonstrukts (vgl. Abb. 4.1C). Daraüber hinaus zeigte sich auch ein signifikant erhöhter SAA1/2-Plasmaspiegel (Abb. 4.3C) bei diesen Mäusen. Da SAA durch den Blutkreislauf in periphere Organe gelangen kann, analysierten wir ebenfalls den Colon von Lgp130-exprimerenden Mäusen und Kontrollmäusen. Dieser wies ebenfalls eine signifikant erhöhte SAA1/2-Proteinmenge im Colon auf (Abb. 4.3D). Daraufhin untersuchten wir Transkripte von *Saa1*, *Saa2* und *Hpt* im Colon, um auszuschließen, dass es durch lokale Expression von intestinalen Epithelzellen dort hingelangt war [228, 229]. Es zeigten sich keine *Saa1* und *Saa2* Transkripte im Colon (Abb. 4.3E). Dies lässt darauf schließen, dass SAA durch den Blutkreislauf in periphere Organe wie den Colon gelangt und sich dort ablagert.

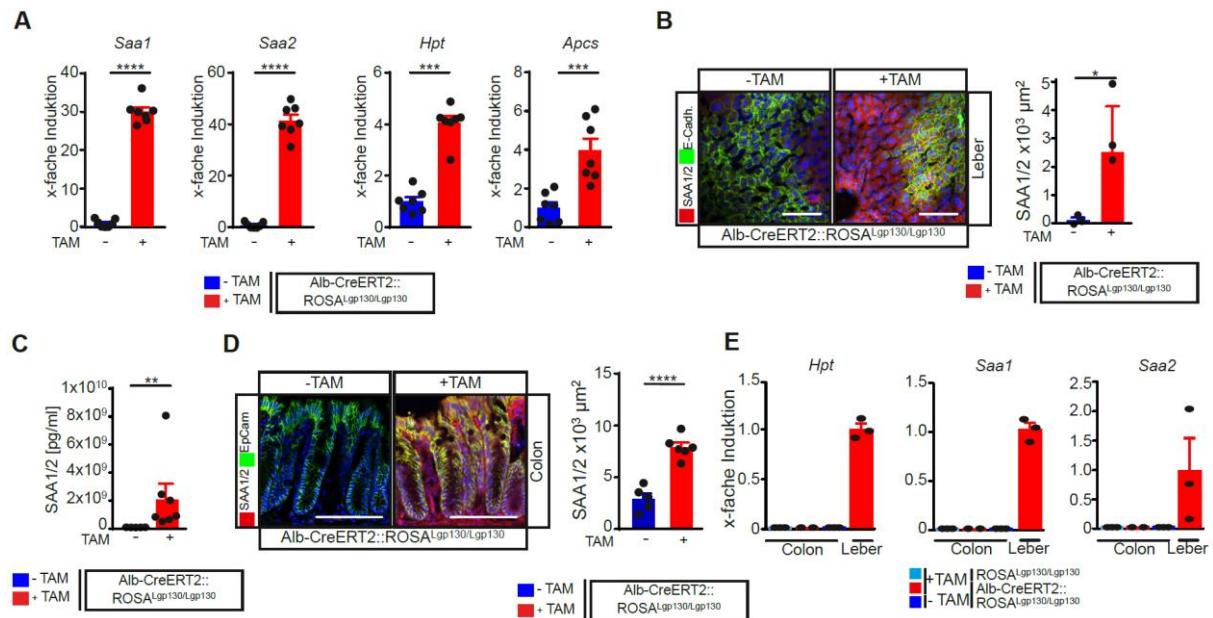


Abb. 4.3: gp130/STAT3 Signalweg induziert Akut-Phase Gen Expression. (A) qRT-PCR für *Saa1*, *Saa2*, *Hpt* und *Apes* in Gesamtleber-RNA zeigte eine Hochregulierung der Akut-Phase-Gene bei Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Expression von Lgp130. (B) Quantitative Immunfluoreszenz zeigten eine signifikant erhöhte Expression von SAA1/2 in Hepatozyten in Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Expression. (C) ELISA Analyse zeigte erhöhte SAA1/2 Plasmawerte bei Mäusen mit Lgp130 Expression in Hepatozyten. (D) Repräsentative Immunfluoreszenz zeigten signifikante SAA1/2-Ablagerungen im Colon. (E) qRT-PCR Analyse zeigte keine transkriptionelle Hochregulierung von Akut-Phase Genen *Saa1*, *Saa2* und *Hpt* im Colon von Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Expression. Als Positivkontrolle diente Gesamtleber mRNA von Lgp130-exprimierten Mäusen. Maßstabsbalken zeigen 100 μm (B) und 25 μm (D). Für die Quantifizierungen wurden mindestens 5 nicht überlappende Bilder pro Maus analysiert. Daten sind Mittelwert ± SEM. n=7 Mäuse / Gruppe (A). n= 3 Mäuse / Gruppe (B, E). n= 7 Mäuse / Gruppe (C-D). *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001. Student's t-test (A, C, D). Mann-Whitney-U Test (A). Mann-Whitney-U Test (B). Einseitige ANOVA mit Dunn's post hoc Test (E).

4.3 Rekrutierung von myeloiden Zellen durch Hepatozyten-spezifische gp130 Aktivierung

Gene-Ontology (GO)-Analyse der am stärksten regulierten Gene in Total-RNA der Leber ergab eine Anreicherung von Genen des Lipidstoffwechsel und Scavenger-Rezeptoren bei Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer gp130 Aktivierung im Gegensatz zu Kontrollmäusen (Daten nicht gezeigt). Transkriptom- und Proteomanalysen von Lebergewebe und peripherem Blutplasma von Lgp130-exprimierenden Mäusen und Kontrollmäusen zeigte in Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer gp130 Aktivierung eine Hochregulation im Bereich der akuten Entzündung, der Zytokinreaktion und bei Prozessen des Immunsystems. Unter den 50 am stärksten regulierten Genen waren Gene die für die APPs Serum-Amyloid A1 und 2 (*SAA1*, *SAA2*), Serum-Amyloid P (*Apc*s), aber auch für das C-X-C-Motiv-Chemokin 1 (*Cxcl1*) und die mit dem adaptiven Immunsystem verbundene IL-17-Rezeptor-Untereinheit A (*IL17Ra*) kodieren (Daten nicht gezeigt). Analysen von isolierten primären Hepatozyten von Lgp130-exprimierenden Mäusen zeigten ebenfalls eine Erhöhung von Genen der angeborenen Immunantwort (vgl. Abb. 4.2). Wir stellten die Hypothese auf, dass parakrine Signale wie *SAA1/2* oder auch *CXCL1* das myeloide Kompartiment innerhalb der Leber verändern könnten. *CXCL1* ist ein Zytokin, welches aus der Familie der CXC-Chemokine stammt und der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in entzündete Gewebe dient [230]. Wir bestimmten *CXCL1*-Plasmaspiegel mittels ELISA und konnten sowohl nach 2, 4 und 60 Wochen nach Lgp130-Induktion einen signifikant erhöhten Plasmaspiegel von *CXCL1* nachweisen bei Lgp130-exprimierenden Mäusen (Abb. 4.4A). Darüber hinaus wiesen diese Mäuse signifikant erhöhte Zellanzahlen von $Gr1^+$ -Granulozyten, *CLEC4F*⁺-Kupffer-Zellen (KCs) und $CD11b^+$ -infiltrierenden myeloide Zellen (iMCs) in der Leber auf (Abb. 4.4B). Erhöhte *CXCL1*-Plasmaspiegel und erhöhte Zellanzahlen von Granulozyten, Kupffer-Zellen und infiltrierenden myeloide Zellen lassen auf eine verstärkte periphere Mobilisierung und Infiltration in die Leber durch die gp130-Signalübertragung in Hepatozyten schließen. Da *CXCL1* in Gesamt-RNA erhöht war, jedoch nicht in der RNA isolierter primärer Hepatozyten, legt dieser Faktor den Schluss nah, dass *CXCL1* von nicht-parenchymalen Zellen gebildet wird. Diese wurden vermutlich durch hepatozytäre gp130-induzierte parakrine Faktoren aktiviert.

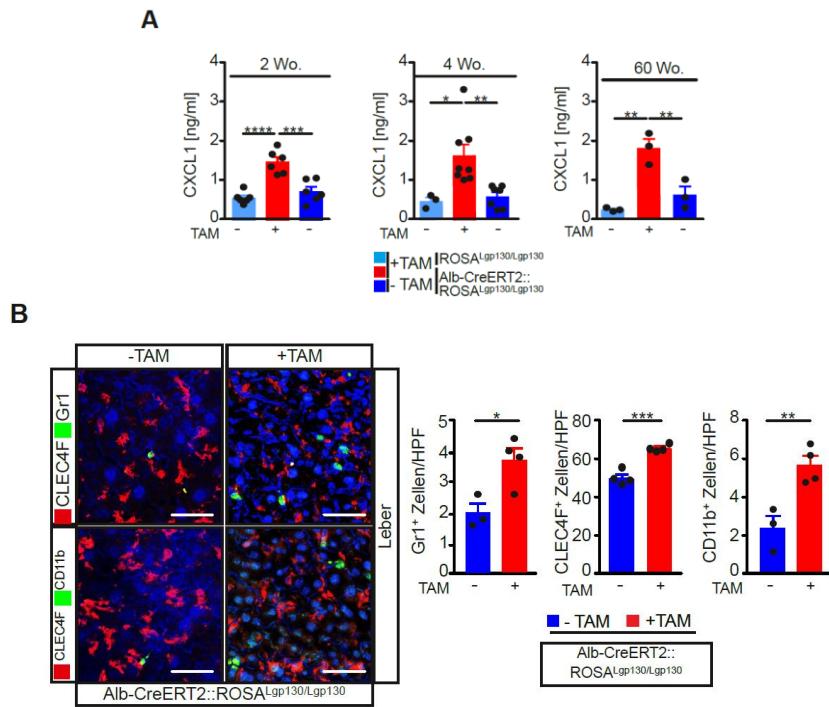


Abb. 4.4: Rekrutierung von myeloiden Zellen durch Hepatozyten-spezifische gp130 Aktivierung. (A) Analyse mittels ELISA zeigte erhöhte CXCL1-Plasmaspiegel in Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Expression von Lgp130. (B) Repräsentative Immunfluoreszenz zeigte erhöhte Anzahl von CLEC4F⁺ Kupffer Zellen (KCs) und Gr1⁺ neutrophile Granulozyten in der Leber von Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Expression. Maßstabsbalken zeigen 25 μ m. Für die Quantifizierung wurden mindestens 5 nicht überlappende Bilder pro Maus analysiert. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. n = 3-4 Mäuse/ Gruppe (B). n = 4 Mäuse / Gruppe. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001. Einseitige ANOVA mit Tukey's post hoc Test (A). Mann-Whitney U Test (B).

4.4 Systemische Amyloidose als Folge langanhaltender Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung

Konstitutiv aktives gp130 ist mit hepatzellulären Adenomen assoziiert, welche durch inflammatorische Infiltrate und erhöhte Akut-Phase-Proteine gekennzeichnet sind [50]. Doppelt transgene Mäuse, die IL-6 und sIL-6R koexprimieren, zeigten einen Anstieg der extramedullären hämatopoetischen Vorläuferzellen in Leber und Milz [231]. Ebenso konnte in IL-6 defizienten Mäusen eine beeinträchtigte Hepatozytenproliferation und Leberregeneration nachgewiesen werden [44]. Daher analysierten wir Mäuse 60 Wochen nach Lgp130-Induktion. Interessanterweise beobachteten wir eine nach wie vor homogene Expression des ZsGreen Reporter-Konstrukts (Abb. 4.5A), was darauf schließen ließ, dass auch 60 Wochen nach Induktion die Lgp-130 Expression stabil war. Die Mäuse zeigten darüber hinaus keine makroskopischen Anzeichen für eine Tumorbildung (Abb. 4.5B) und keine morphologische Veränderung der parenchymalen Leberzellen in H/E-gefärbten Leberschnitten (Abb. 4.5C).

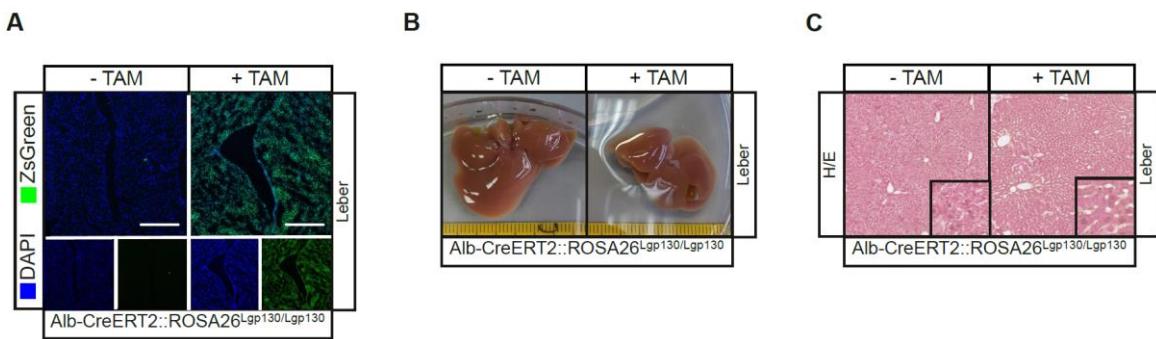


Abb. 4.5: Keine Induktion von Lebertumoren bei anhaltender Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung. (A) Expression von Lgp130 in Hepatozyten war anhaltend hochreguliert und gleichmäßig über das gesamte Leberparenchym verteilt. (B-C) Anhaltende Lgp130 Aktivierung führt zu keiner Veränderung des Leberparenchyms oder Induktion von Lebertumoren. Maßstabsbalken zeigen 100 μm (A). n= 3 Mäuse / Gruppe (A-C).

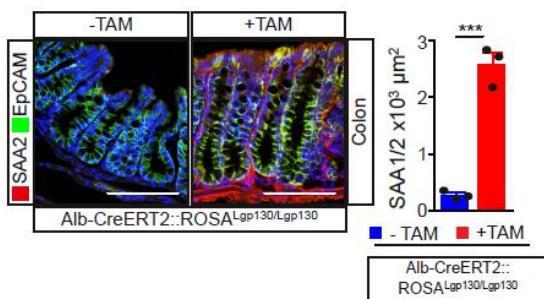
Patienten mit langanhaltender Erhöhung von Akut-Phase-Proteinen, insbesondere der Akut-Phase-Proteine SAA1 und SAA2, wiesen im Verlauf ihrer Krankheit ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer AA Amyloidose auf [150].

Daher analysierten wir Mäuse mit anhaltender Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung 60 Wochen nach Induktion. Analysen mittels Immunfluoreszenz zeigten Amyloidablagerungen und signifikant erhöhte Expression von SAA2 im Colon (Abb. 4.6A) bei gealterten Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression. Darüber hinaus

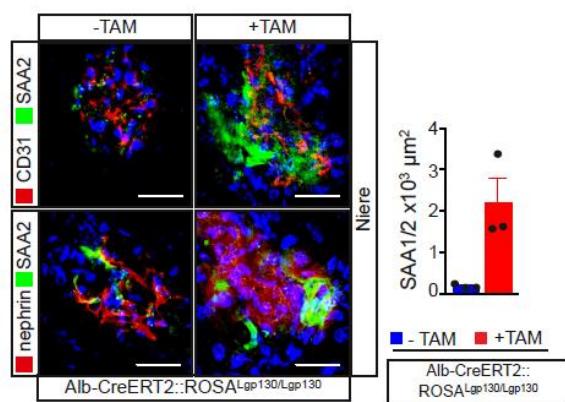
konnten wir ebenfalls signifikant erhöhte Ablagerungen von SAA2 in der Niere (Abb. 4.6B) und der Milz (Abb. 4.6C) in Tamoxifen-induzierten Mäusen beobachten. Patienten mit langanhaltender Erhöhung von Akut-Phase-Proteinen, insbesondere der Akut-Phase-Proteine SAA1 und SAA2, wiesen im Verlauf ihrer Krankheit ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer

AA Amyloidose auf

A



B



C

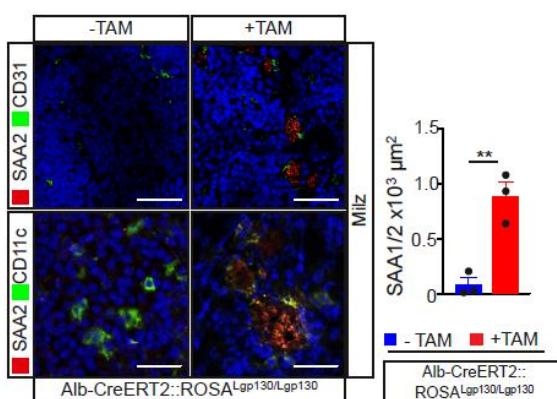


Abb. 4.6: Anhaltende Hepatozyten-spezifische Lgp130 Aktivierung führt zu einer systemischen Amyloidose. (A) Repräsentative Immunfluoreszenz zeigte signifikante SAA2 Ablagerungen im Colon, (B) in Niere und (C) Milz von alten Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung. Maßstabsbalken zeigen 100 μm (A). Maßstabsbalken zeigen 25 μm (B, C). Für die Quantifizierungen wurden mindestens 5 nicht überlappende Bilder pro Maus analysiert. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. n = 3 Mäuse / Gruppe (A-C). **p <0.01, ***p <0.001. Student's t-Test (A, C). Mann-Whitney-U Test (B).

Nachdem bei jungen Mäusen eine verstärkte periphere Mobilisierung und Infiltration von myeloiden Zellen in die Leber durch die Hepatozyten-spezifische Lgp130 Aktivierung nachgewiesen werden konnte, analysierten wir dies auch in Mäusen mit anhaltender Lgp130-Expression. In der Leber von alten Mäusen konnten wir, ähnlich wie bei jungen Mäusen (vgl. Abb. 4.4B), eine signifikant erhöhte Anzahl von CD11b⁺ Zellen und eine leichte Erhöhung von Gr1⁺ Zellen aufzeigen (Abb. 4.7A). Auch im Dickdarm von alten Mäusen konnte eine erhöhte Infiltration von CD11b⁺ Zellen bei Tamoxifen-induzierten Mäusen im Vergleich zu

Kontrollmäusen nachgewiesen werden (Abb. 4.7B). Dies zeigt, dass eine hepatozytäre gp130-Aktivierung zu einer Entzündung in entfernten Organen führen kann.

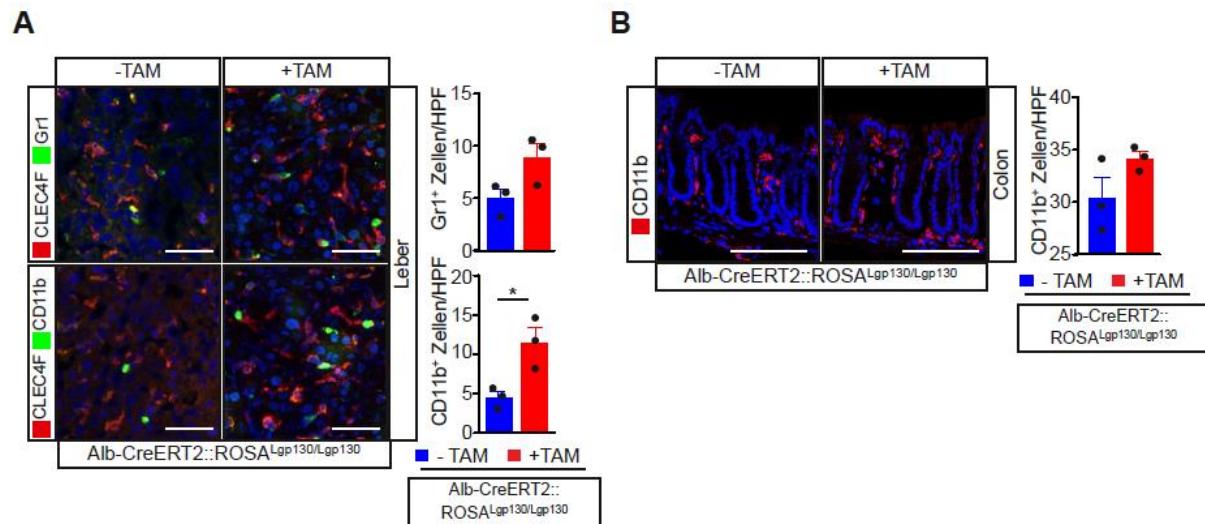


Abb. 4.7: Erhöhte Anzahl von myeloiden Zellen bei gealterten Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Aktivierung. (A) Repräsentative Immunfluoreszenz zeigte erhöhte Anzahl von myeloiden Zellen bei gealterten Mäusen mit Lgp130-Expression in Hepatozyten. Maßstabsbalken zeigt 25 μ m. (B) Die Anzahl von mukosalen CD11⁺ myeloiden Zellen im Colon zeigte sich in der Immunfluoreszenz bei gealterten Mäusen Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung erhöht. Maßstabsbalken zeigt 50 μ m. Für die Quantifizierungen wurden mindestens 5 nicht überlappende Bilder pro Maus analysiert. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. n = 3 Mäuse / Gruppe. *p <0.05, Student's t-Test (A, B).

4.5 Keine morphologische Veränderung im Colon durch Lgp130 Aktivierung in Hepatozyten

Wir konnten bereits zeigen, dass SAA1/2-Ablagerungen im Colon durch erhöhte SAA1/2 Plasmaspiegel hervorgerufen werden können. Deshalb untersuchten wir nachfolgend, ob dies zu Auswirkungen und morphologischen Veränderungen im Colon von Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Aktivierung führte. Der Colon von Mäusen mit Lgp130-Expression in Hepatozyten und Kontrollmäusen wies 3 Wochen nach Induktion weder morphologische Veränderungen (Abb. 4.8A), noch Veränderungen der Colonlänge auf (Abb. 4.8B). In H/E-gefärbten Colonschnitten konnten wir keine Veränderungen der Kryptenlänge zwischen Kontrolltieren und Tieren mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression feststellen (Abb. 4.8C). Mit Hilfe der *periodic acid-Schiff reaction* (PAS) Färbungen werden Polysaccharide, in diesem Fall Muzine, in den Becherzellen magentafarben gefärbt [232]. Es konnte keine Veränderung der Becherzellenanzahl in PAS-Färbungen von Colonkrypten (Abb. 4.8D) bei Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression im Vergleich zu

den Kontrollmäusen aufgezeigt werden. Da Becherzellen für die Kontrolle der Penetration der Darmbarriere durch kommensale und pathogene Bakterien unerlässlich sind, ließ die unveränderte Becherzellenanzahl auf eine aufrechte intestinale Homöostase bei Lgp130-exprimierenden Mäusen schließen. Die Proliferationsrate im Darm wurde mittels Ki67 Immunfluoreszenz analysiert, wobei Ki67⁺-Zellen gleichmäßig über die gesamte Krypte verteilt waren. Hierbei war jedoch kein Unterschied zwischen Mäusen mit Lgp130 Expression in Hepatozyten und Kontrollmäusen in der Anzahl der Ki67⁺-Zellen und somit in der Proliferationsrate vorhanden (Abb. 4.8E). SAA Ablagerungen und geringe Entzündungen im Colon haben somit keinen Einfluss auf die morphologischen Strukturen im Darm und die Integrität der Barriereforschicht zwischen Darmepithel und Darmflora.

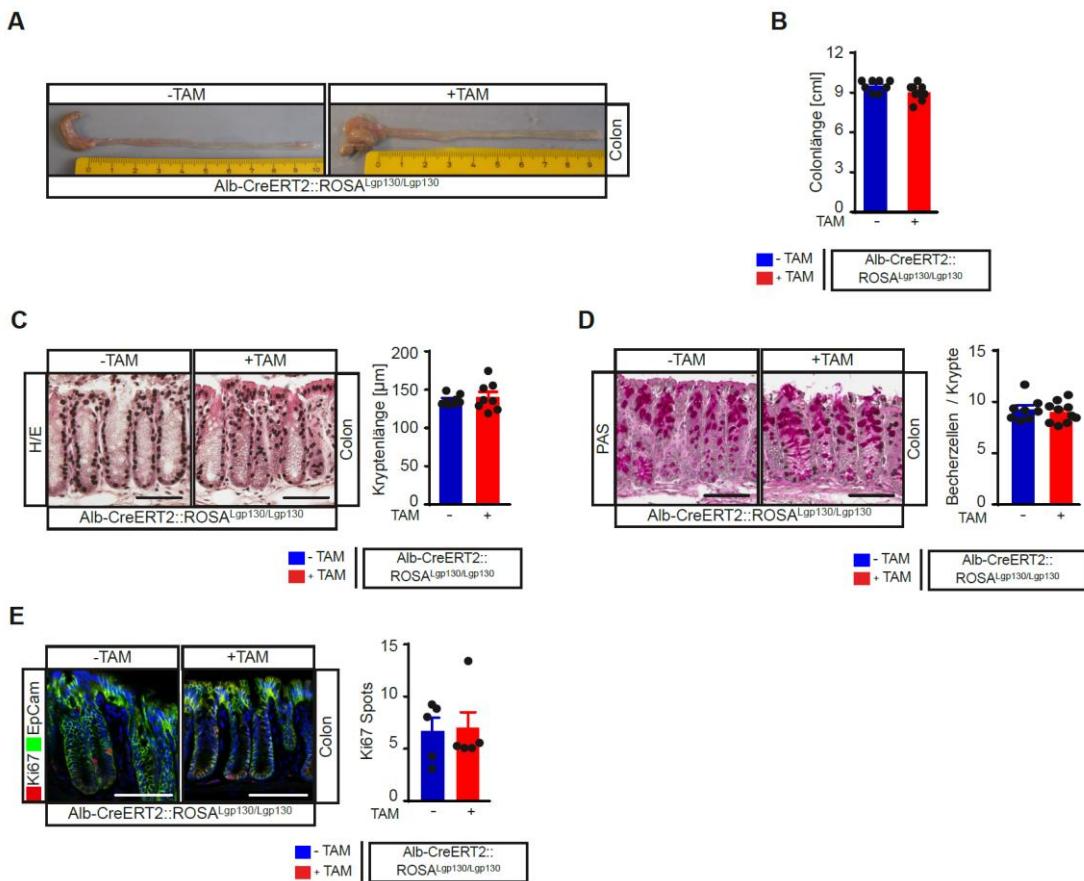


Abb. 4.8: Keine morphologische Veränderungen im Colon durch Lgp130 Aktivierung in Hepatozyten. (A) Repräsentative Bilder von Colons nach Lgp130 Aktivierung in Hepatozyten. (B) Mäuse mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung weisen keine veränderte Colonlänge auf. (C-D) Repräsentative Histochemie zeigte unveränderte Kryptenlänge und Anzahl von Becherzellen im Colon von Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung. (E) Repräsentative Immunfluoreszenz zeigte keine Veränderung von Ki67⁺ Zellen in Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung. Maßstabsbalken zeigen 250 µm (C, D) und 100 µm (E). Für die Quantifizierungen wurden mindestens 5 nicht überlappende Bilder pro Maus analysiert. Daten sind Mittelwerte ± SEM. n = 5-6 Mäuse / Gruppe. Mann-Whitney-U Test (B, E). Student's t-Test (C, D).

SAA-Proteine können in Kombination mit IL-6 einen pathogenen T_H17-Phänotyp in naiven CD4+ T-Zellen induzieren, unabhängig von TGF β [26]. Mäuse mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression wiesen ein sich am Detektionslimit befindenden, sehr geringen IL-17 Zytokinspiegel in Colon-Proteinlysaten auf. Dieses war im Vergleich zu Kontrolltieren unverändert. Lgp130-induzierte Mäuse wiesen leicht erhöhte IL-1 β Zytokinspiegel in Colon-Proteinlysaten auf, während IL-6 und IL-23 Zytokinspiegel bei Mäusen mit Lgp130-Expression signifikant hochreguliert waren im Vergleich zu Kontrolltieren (Abb. 4.9). Dies lässt auf eine vermehrte Induktion von IL-23 in Zellen des Colons, vermutlich durch ILCs/DCs durch zellautonome gp130-Aktivierung in Hepatozyten schließen.

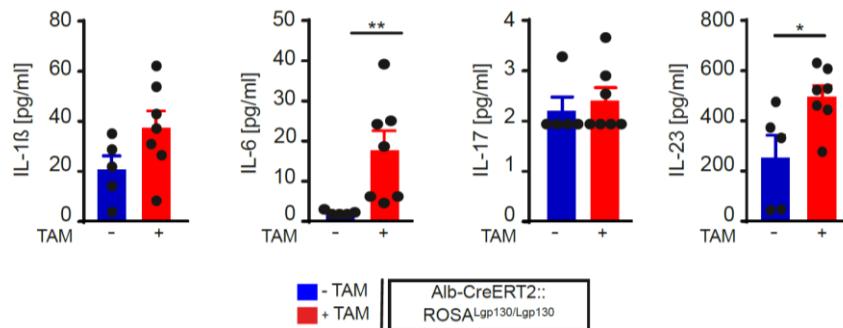


Abb. 4.9: Hepatozyten-spezifische gp130-Aktivierung führt zu erhöhten IL-6 und IL-23 Spiegeln im Colon. Multiplex ELISA zeigte signifikant erhöhte IL-6 und IL-23 Spiegel in Colonlysaten von Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Aktivierung, jedoch keine veränderte IL-17 Konzentration. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. n = 5-7 Mäuse / Gruppe. *p <0,05, **p <0,01. Student's t-Test, Kolmogorov-Smirnov Test, Mann-Whitney-U Test.

4.6 Lgp130 Aktivierung in Hepatozyten führt zu geringerem Schweregrad bei einer DSS-Kolitis

Um den Einfluss Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression auf entzündliche Vorgänge im Darm, insbesondere des Colons zu bestimmen, exponierten wir Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse mit DSS, welches zur Störung der Darmepithelbarriere und zur Induktion einer Kolitis führt [223, 233, 234]. Hierzu wurden Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse an vier aufeinander folgenden Tagen mit Tamoxifen oder Ethanol/Öl injiziert und erhielten zur Induktion einer akuten Kolitis nach einer Karenzzeit von 7 Tagen 2 % DSS über das Trinkwasser (Abb. 4.10A). Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse zeigten einen signifikant erhöhten Gewichtsverlust zwischen Tag 4 und 6 im Vergleich zu Kontrollmäusen, wobei sich beide Gruppen an Tag 9

wieder auf das gleiche Gewichtsniveau erholten (Abb. 4.10B). Die Kolonlänge stellt bei einer akuten DSS-induzierten Kolitis einen wichtigen Parameter zur Bestimmung des Entzündungsgrades dar. Das Epithel wird durch die auftretenden Entzündungen zerstört, was im Verlauf der Wundheilung zu einer Ausschüttung von Fibrin und somit zu einer Verkürzung des Colon führt [235]. Im Vergleich zu Mäusen ohne DSS wiesen sowohl Tamoxifen-injizierte Mäuse als auch Kontrollmäuse nach Induktion einer DSS-Kolitis eine signifikant verkürzte Colonlänge auf (Daten nicht gezeigt). Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen den Lgp130-exprimierenden und den Kontrollmäusen beobachtet werden (Abb. 4.10C). Die Proliferation von Epithelzellen und die damit verbundene Verlängerung der Krypten (Hyperplasie) werden als Merkmal verstärkter Regeneration und zur Bestimmung des Schweregrades der Entzündung bei Dünnd- und Dickdarmentzündungen herangezogen [168]. DSS-induzierte Entzündungen führen zu einer Störung der intestinalen Barrierefunktion, was eine Infiltration von Immunzellen in die Lamina propria zur Folge haben kann [236]. Histologische Analysen von H/E gefärbten Colonkrypten zeigten eine verringerte Hyperplasie von Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression im Vergleich zu Kontrollmäusen. Darüber hinaus wiesen beide Gruppen großflächige Infiltrate von Immunzellen auf (Abb. 4.10D). Becherzellen stellen einen wichtigen Bestandteil der intestinalen angeborenen Immunität dar. Der Verlust von Becherzellen kann daher zur Bestimmung des Schweregrades der Darmentzündung herangezogen werden. Der Verlust der Barriereschicht zwischen Darmepithel und Darmflora kann das Eindringen von Pathobionten und unverdauten Nahrungspartikeln begünstigen [168]. Kontrollmäuse wiesen bei der Analyse von mit PAS gefärbten Colonkrypten einen signifikant stärkeren Becherzellenverlust auf als Lgp130 exprimierende Mäuse (Abb. 4.10E). Um die Auswirkungen Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression in intestinalen Epithelzellen auf die Darmregeneration zu untersuchen, wurden Ki67 Immunfluoreszenz-Färbungen analysiert. Tamoxifen-injizierte Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse zeigten gleiche Mengen von proliferierenden Zellen wie die Kontrollmäuse, welche sich gleichmäßig über die gesamte Krypte verteilten (Abb. 4.10F). Trotz eines erhöhten Gewichtsverlusts zeigten Mäuse mit einer Hepatozyten-spezifischen Lgp130-Expression eine geringere histologisch aktive Entzündung bei der DSS-Kolitis als Kontrollmäuse.

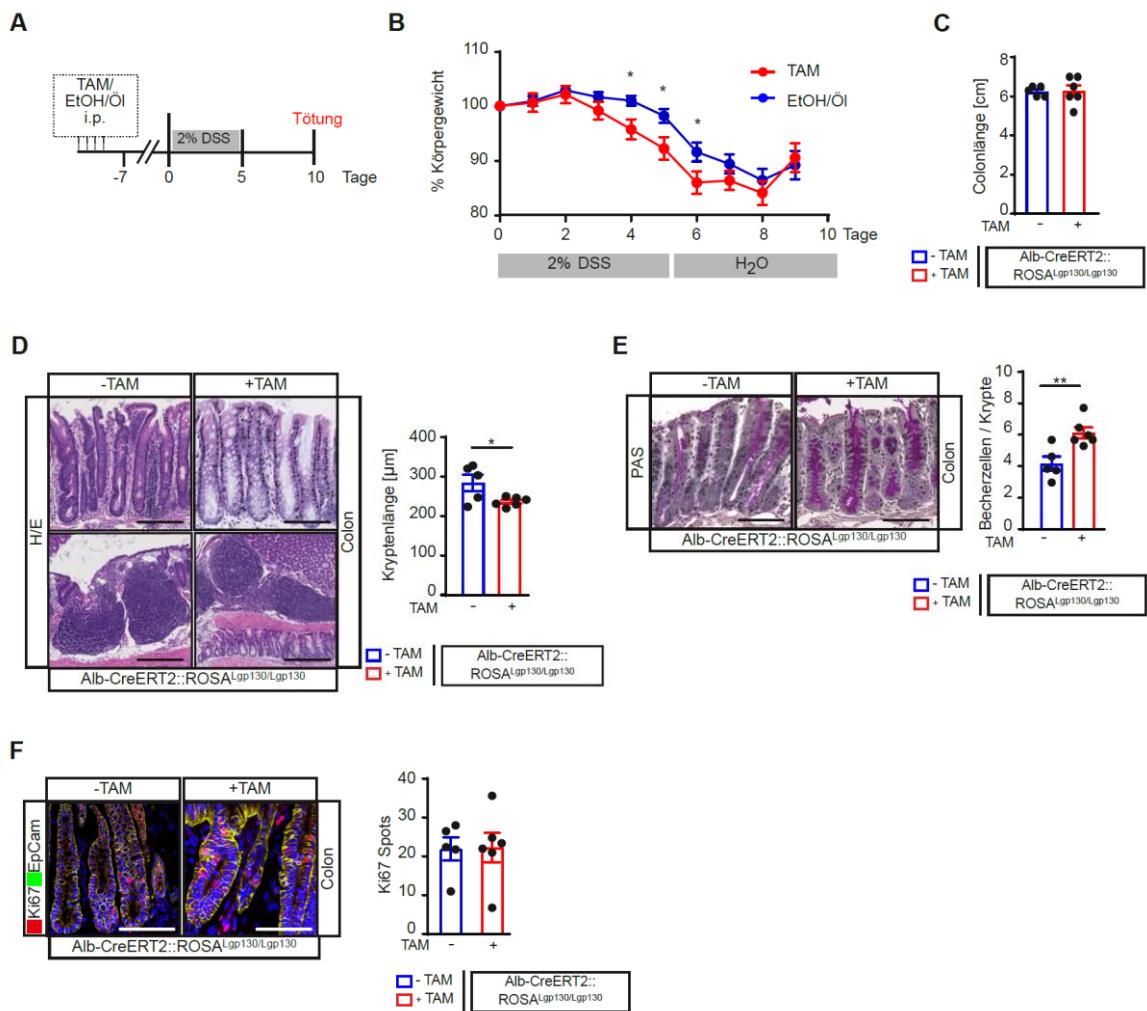


Abb. 4.10: Alb-CreERT2::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse zeigen geringeren Schweregrad bei DSS-Kolitis trotz vermehrtem Gewichtsverlust. (A) Experimentelle Versuchsdurchführung der DSS-Kolitis. (B) Prozentuale Körperfgeicht von Kontroll- und Lgp130 induzierten Mäusen über einen Zeitraum von 10 Tagen. Tamoxifen-induzierte Mäuse zeigten ein signifikant reduziertes Körperfgeicht zwischen Tag 4-6. (C) Mäuse mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung wiesen keine veränderte Colonlänge nach einer DSS-Kolitis auf im Vergleich zu Kontrolltieren. (D) Lgp130-Expression in Hepatozyten führt nicht zu einer veränderten Colonlänge während einer DSS-induzierten Kolitis. (E) Anzahl an Becherzellen unter entzündlichen Bedingungen ist erhöht in Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression. (F) Keine veränderte Anzahl von Ki67+ Zellen nach einer DSS-Kolitis bei Tamoxifen-induzierten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren. Maßstabsbalken zeigen 250 µm (D, E). Maßstabsbalken zeigen 100 µm (F). Für die Quantifizierung wurden mindestens 5 nicht überlappende Bilder pro Maus analysiert. Daten sind Mittelwerte ± SEM. n = 5-6 Mäuse / Gruppe (A-E). n = 2-3 Mäuse / Gruppe (F). *p <0,05, **p <0,01. Student's t-Test (C, D, E).

Die Akut-Phase-Proteine SAA1 und SAA2 werden als Reaktion auf lokale und systemische Gewebeschädigungen und Störungen induziert, wobei es in der Leber synthetisiert und über den Blutkreislauf in periphere Organe transportiert wird [133, 135, 136]. Studien zeigten bereits, dass erhöhte SAA-Werte mit einer histologisch aktiven Entzündung [237] und der klinischen Aktivität verbunden sind [238]. Sowohl Mäuse mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression, als auch Kontrollmäuse wiesen nach einer DSS-induzierten Kolitis SAA1/2-Ablagerungen im Darm auf (Abb. 4.11A), wobei kein Unterschied von *Saa1* und *Saa2* Transkripten festzustellen war (Abb. 4.11B). Allerdings zeigten Lgp130-exprimierende Mäuse einen signifikant erhöhten SAA1/2-Plasmaspiegel (Abb. 4.11C). Dies spricht dafür, dass durch die Kolitis bei beiden Mausgruppen im Colon lokal SAA induziert wird. Mäuse mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression wiesen jedoch im Gegensatz zu Kontrollmäusen während der akuten Entzündung eine vergleichsweise schnelle SAA1/2 Erhöhung des Plasmaspiegels auf.

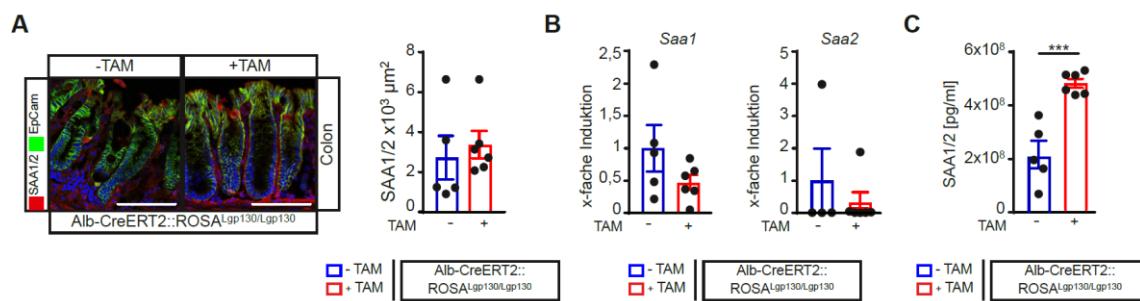


Abb. 4.11: Erhöhte SAA1/2 Serumspiegel führen nicht zu einer akut vermehrten SAA1/2 Ablagerungen im Colon. (A) Repräsentative Immunfluoreszenz zeigte keine vermehrten SAA1/2 Ablagerungen im Colon nach einer DSS-Kolitis bei Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung. Für die Quantifizierung wurden mindestens 5 nicht überlappende Bilder pro Maus analysiert. (B) Keine transkriptionelle Erhöhung der Expression von *Saa1* oder *Saa2* im Colon von Tamoxifen-induzierten Mäusen. (C) ELISA Analyse zeigte eine Erhöhung von SAA1/2 im Plasma von Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung nach einer DSS-Kolitis. Maßstabsbalken zeigen 100 μ m (A). Daten sind Mittelwerte \pm SEM. n = 5-6 Mäuse / Gruppe (A, C). n = 4-6 Mäuse / Gruppe (B). ***p < 0.001. Mann-Whitney-U Test (A). Student's t-Test, Mann-Whitney U Test (B). Student's t-Test (C).

Im Gegensatz zu Mäusen, welche keine DSS-Kolitis durchlaufen haben (vgl. Abb. 4.9), wurde der Unterschied der Zytokinspiegel in Colon-Proteinlysaten in der akuten Entzündung aufgehoben (Abb. 4.12A). Demnach könnte SAA, welches in der akuten Entzündung wahrscheinlich lokal produziert wird, die Sekretion inflammatorischer Zytokine wie IL-6 oder IL-23 in Immunzellen der Lamina propria induzieren.

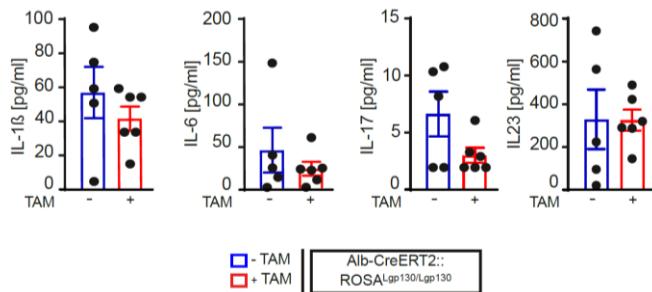


Abb. 4.12: Verminderte Zytokinexpression im Colon von Mäusen nach DSS-Kolitis. Multiplex-Analyse zeigte unveränderte Expression von IL-1 β , IL-6 und IL-23, jedoch eine leichte Expressionsreduktion von IL-17 von Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 nach einer DSS-Kolitis. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. n = 5-6 Mäuse / Gruppe. Student's t-Test, Kolmogorov-Smirnov Test.

4.7 Vermehrte Tumorinduktion nach einer AOM/DSS-Kolitis durch Hepatozyten-spezifische Lgp130 Aktivierung

Analysen humaner kolorektaler Karzinom-Proben zeigten bereits, dass IL-6 bei Patienten sowohl im Serum als auch im Tumorgewebe signifikant hochreguliert ist [215, 216]. Zudem werden erhöhte SAA-Werte bei Darmkrebs mit einem fortgeschrittenen Krankheitsverlauf und einer schlechteren Überlebensrate assoziiert [239-242]. Deshalb stellten wir die Hypothese auf, dass Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse mit systemischer Erhöhung von Akut-Phase-Proteinen eine verstärkte Tumorinduktion oder -progression haben und anfälliger für experimentell induzierte Tumorigenese sein könnten. Um die physiologische Rolle von Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression bei Kolitis-assoziiertem Darmkrebs zu untersuchen, exponierten wir Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse einem AOM/DSS-Kolitis Krebsmodell. Hierzu wurden Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse an vier aufeinander folgenden Tagen mit Tamoxifen oder Ethanol/Öl injiziert. Nach einer Karenzzeit von 7 Tagen erhielten die Mäuse eine Injektion von 10 mg/KG Körpergewicht AOM, welches DNA-Schäden in intestinalen Epithelzellen auslöst und zusammen mit drei Zyklen 1 % DSS über das Trinkwasser zur Induktion eines Kolitis-assoziierten kolorektalen Karzinoms führte (Abb. 4.13A). Mäuse mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression zeigten ähnlich wie bei der akuten DSS-Kolitis (vgl. Abb. 4.10) einen signifikant erhöhten Gewichtsverlust zwischen den Tagen 7 und 14, den Tagen 21 und 28, den Tagen 42 und 49, sowie eine signifikant schlechtere Gewichtserholung nach Beendigung der DSS-Zyklen (Abb. 4.13B). 100 Tage nach AOM-Injektion zeigten sich makroskopisch sichtbare Tumore bei Mäusen beider Gruppen (Abb. 4.13C). Es konnte keine Veränderung bezüglich der Colonlänge zwischen den Lgp130-exprimierenden und den Kontrollmäusen beobachtet werden.

Allerdings wiesen Mäuse mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression eine erhöhte Tumorlast auf (Abb. 4.13E). Eine konstitutive Aktivierung von gp130 in Hepatozyten nimmt somit eine wesentliche Rolle bei der Tumorinduktion bei der entzündungserweiterten Karzinogenese ein.

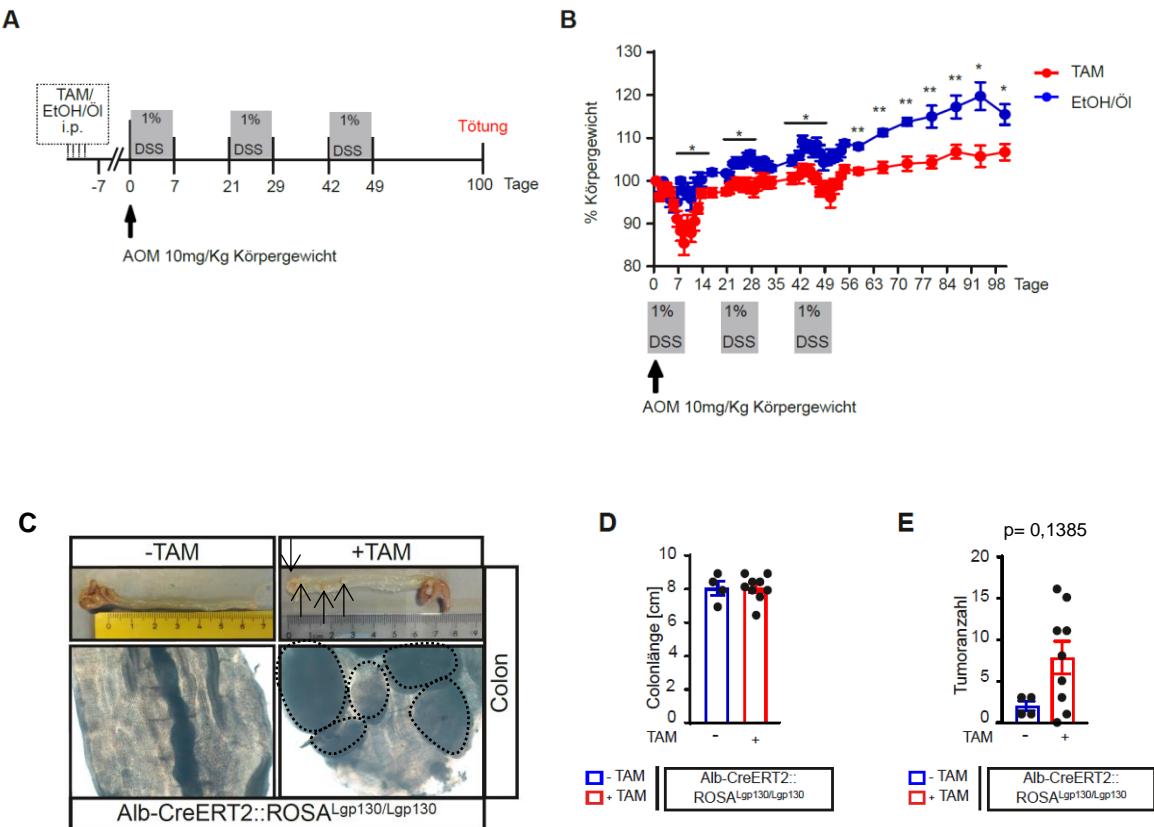


Abb. 4.13: Vermehrte Tumorinduktion bei Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen nach einer AOM/DSS-Kolitis. (A) Versuchsaufbau der AOM/DSS-Kolitis. (B) Prozentuelles Körpergewicht von Kontroll- und Lgp130 induzierten Mäusen über einen Zeitraum von 100 Tagen. Tamoxifen-induzierte Mäuse zeigten ein signifikant reduziertes Körpergewicht. (C) Repräsentative Bilder von entfernten Colons von AOM/DSS behandelten Mäusen. (D) Mäuse mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung zeigten unveränderte Colonlänge. (E) Erhöhte Tumoranzahl im Colon von Tamoxifen-induzierten Mäusen. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. n = 8-9 Mäuse / Gruppe (B). n = 4-9 Mäuse / Gruppe (D-E). *p <0,05, **p <0,01. Student's t-Test (B, D). Mann-Whitney-U Test (B, E).

Neben der Tumorinduktion stellen auch histologische Analysen eine Einstufung des Schweregrades der AOM/DSS-Kolitis dar [243]. Hierbei zeigten H/E gefärbte Kolonkryptabschnitte tumorfreier Bereiche eine signifikante Hyperplasie bei den Kontrollmäusen im Vergleich zu Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression (Abb. 4.14A). In PAS gefärbten Colonkrypten wiesen Lgp130- exprimierende Mäuse im

Vergleich zu Kontrollmäusen einen signifikant stärkeren Becherzellenverlust auf (Abb. 4.14B), was auf eine gestörte Differenzierung intestinaler Epithelzellen zurückzuführen sein könnte. Wir konnten keine signifikanten Unterschiede in der Proliferationsrate in tumorfreiem, noch in tumorhaltigem Colongewebe bei beiden Gruppen finden (Abb. 4.14C). Die erhöhte Tumorlast der Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse lässt sich somit nicht auf Unterschiede in der Proliferation zurückführen, wobei aufgrund von Entzündung eine vermehrte Schädigung der Barrièreschicht zwischen Darmepithel und Darmflora in Mäusen mit Lgp130-Expression in Hepatozyten vorliegt.

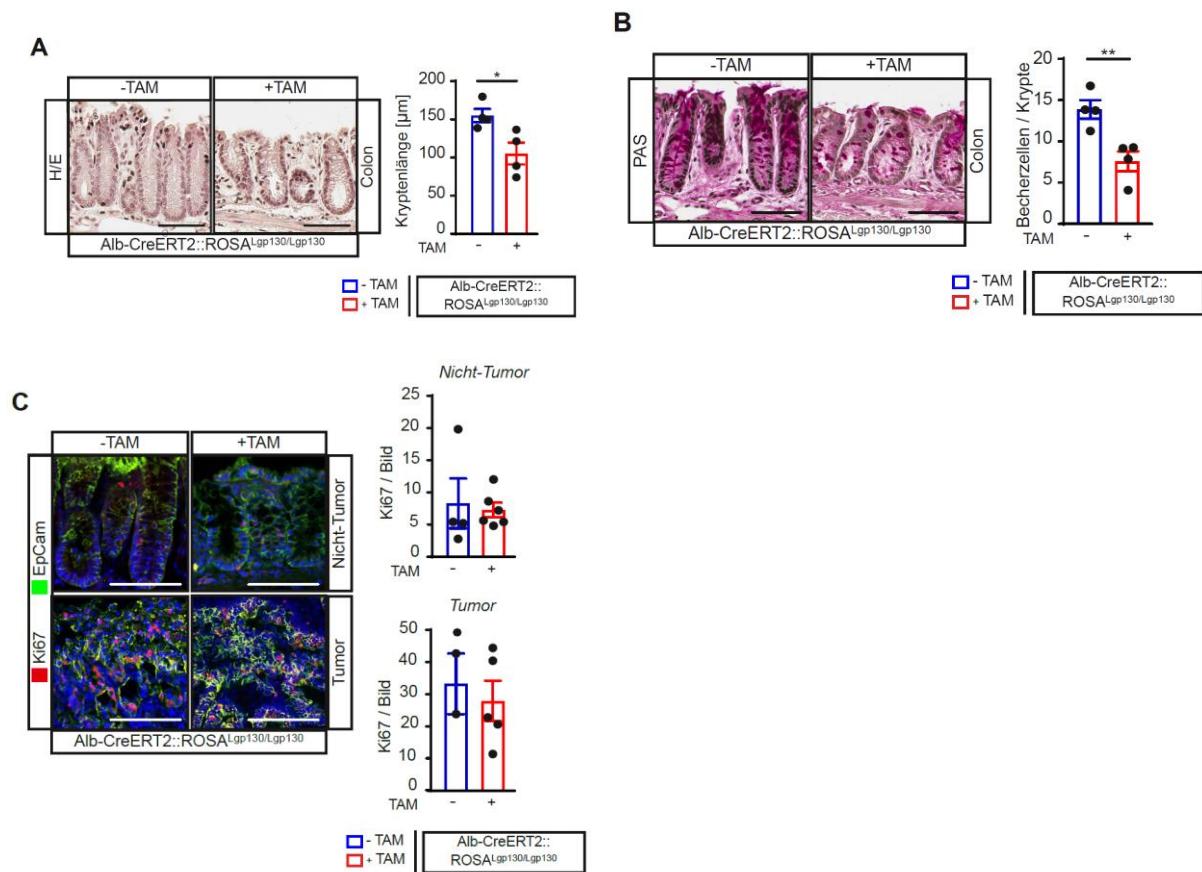


Abb. 4.14: Verringerte Hyperplasie bei Lgp130 induzierten Mäusen nach einer AOM/DSS-Kolitis. (A) Repräsentative histochemische Färbungen zeigen verringerte Kryptenlänge bei Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung nach einer AOM/DSS-Kolitis. (B) Signifikant verringerte Anzahl von Becherzellen nach einer AOM/DSS-Kolitis bei Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung in repräsentativen histochemischen Färbungen. (C) Repräsentative Immunfluoreszenz zeigt keinen Unterschied in der Anzahl von Ki67+ Zellen im Tumor- und Nicht-Tumorgewebe des Colons nach einer AOM/DSS-Kolitis bei Kontroll- und Lgp130 induzierten Mäusen. Maßstabsbalken zeigen 250 µm (A, B) und 100 µm (C). Für die Quantifizierungen wurden mindestens 5 nicht überlappende Bilder pro Maus analysiert. Daten sind Mittelwerte ± SEM. n = 4 Mäuse / Gruppe (A, B). *p < 0,05, **p < 0,01. Student's t-Test (A, B, C).

Bei Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression konnten nach Induktion eines Koliitis-assoziiertem kolorektalen Karzinoms signifikant mehr SAA-Ablagerungen in Nicht-Tumorregionen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden als bei Kontrollmäuse (Abb. 4.15A), wobei wir keine Unterschiede in der lokalen *Saa1* oder *Saa2* Transkription messen konnten (Abb. 4.15B). Allerdings konnte ein signifikant erhöhter SAA1/2-Plasmaspiegel nachgewiesen werden (Abb. 4.15C). Bei akuter Schädigung wird SAA lokal hochreguliert, während sich bei einer chronischen Situation und nach Regeneration das periphere SAA im Darm ablagert.

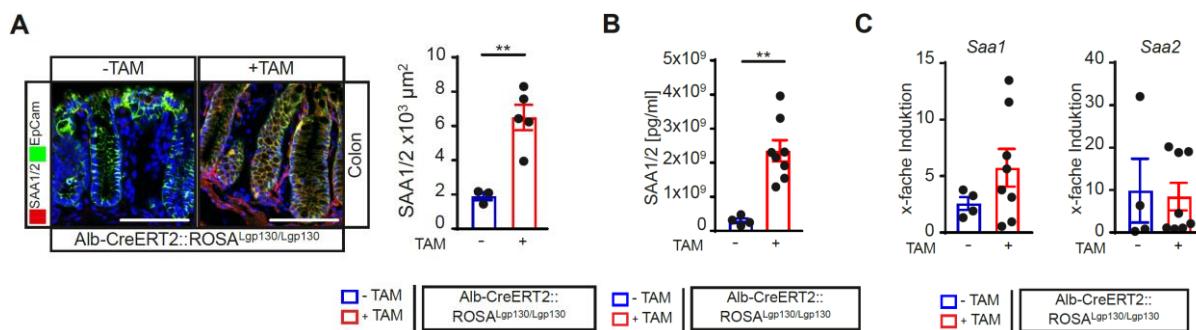


Abb. 4.15: Erhöhte SAA1/2 Serumspiegel und vermehrte Ablagerungen im Colon nach einer AOM/DSS-Kolitis. (A) Repräsentative Immunfluoreszenz zeigte signifikant vermehrte SAA1/2 Ablagerungen im Colon nach einer AOM/DSS-Kolitis bei Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung. Für die Quantifizierungen wurden mindestens 5 nicht überlappende Bilder pro Maus analysiert. (B) ELISA Analyse zeigte eine signifikante Erhöhung von SAA1/2 im Plasma von Mäusen mit Lgp130 Aktivierung in Hepatozyten nach einer AOM/DSS-Kolitis. (C) qRT-PCR zeigte keine transkriptionelle Erhöhung der Expression von *Saa1* oder *Saa2* im Colon von Tamoxifen-induzierten Mäusen. Maßstabsbalken zeigen 100 µm (A). Daten sind Mittelwerte ± SEM. n = 3-5 Mäuse / Gruppe (A). n = 4-8 Mäuse / Gruppe (B, C). **p <0,01. Mann-Whitney-U Test (A, C). Student's t-Test (B).

Die vermehrte Differenzierung naiver T-Zellen zu T_H17-Zellen ist ein Kennzeichen für ein frühes Stadium des kolorektalen Karzinoms und wirkt sich negativ auf die Prognose von Patienten aus [244, 245]. Nach Induktion eines Koliitis-assoziiertem kolorektalen Karzinoms konnte bei Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression signifikant erhöhte IL-1β und IL-23 Konzentrationen im Darm nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte eine leichte Konzentrationserhöhung von IL-6 und IL-17 aufgezeigt werden (Abb. 4.16). Da jedoch sowohl die IL-6, als auch die IL-17 Konzentration im Darm am Detektionslimit detektiert wurde, sollten diese Ergebnisse nicht überinterpretiert werden.

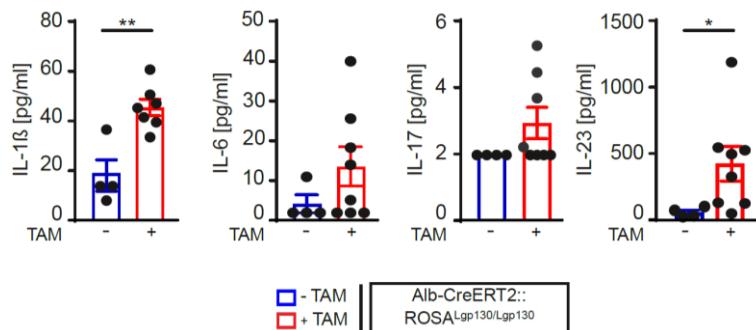


Abb. 4.16: Signifikant erhöhte IL-1 β und IL-23 Spiegel im Colon nach einer AOM/DSS-Kolitis. Multiplex Analysen zeigen signifikant erhöhte IL-1 β und IL-23 Spiegel in Colon Lysaten von Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung nach einer AOM/DSS-Kolitis. IL-6 und IL-17 Spiegel sind leicht erhöht. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. n = 4-8 Mäuse / Gruppe. *p <0,05, **p <0,01. Student's t-Test, Mann-Whitney-U Test, Welch's t-Test.

4.8 Lgp130 Aktivierung in intestinalen Epithelzellen führt zu leicht veränderter Darmmorphologie

Um den Effekt einer lokalen SAA-Erhöhung auf Entzündungsprozesse im Darm zu analysieren und den Unterschied zu einer systemischen Entzündungsreaktion und der Erhöhung von Akut-Phase-Proteinen zu untersuchen, generierten wir das Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mausmodell mit zellautonomer Lgp130-Expression in intestinalen Epithelzellen.

Zur Analyse zellautonomer Lgp130-Expression in intestinalen Epithelzellen induzierten wir Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse an vier aufeinander folgenden Tagen mit TAM oder Ethanol/Öl und analysierten diese nach 3 Wochen (Abb. 4.17A). Lgp130 exprimierende Mäuse zeigten einen makroskopisch unauffälligen Darm auf (Abb. 4.17B), wiesen jedoch signifikant erhöhte Expression von *lgp130* in der total RNA aus dem Colon (Abb. 4.17D), wohingegen dies in den Kontrollgruppen fehlte. Bei unveränderter Colonlänge (Abb. 4.17C) zeigten histologische Analysen von H/E gefärbten Colonkrypten eine leicht aber signifikant erhöhte Kryptenlänge bei Mäusen mit zelltyp-spezifischer Lgp130-Expression in intestinalen Epithelzellen im Vergleich zu Kontrollmäusen auf (Abb. 4.17E). Darüber hinaus konnte eine leichte, aber signifikant erhöhte Anzahl an Becherzellen in PAS gefärbten Colonkrypten beobachtet werden (Abb. 4.17F). Das Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mausmodell stellt daher ein geeignetes Modell zur Analyse konstitutiv aktiver IL-6 Signalgebung in intestinalen Epithelzellen und den Auswirkungen lokaler Entzündungsreaktionen im Darm dar.

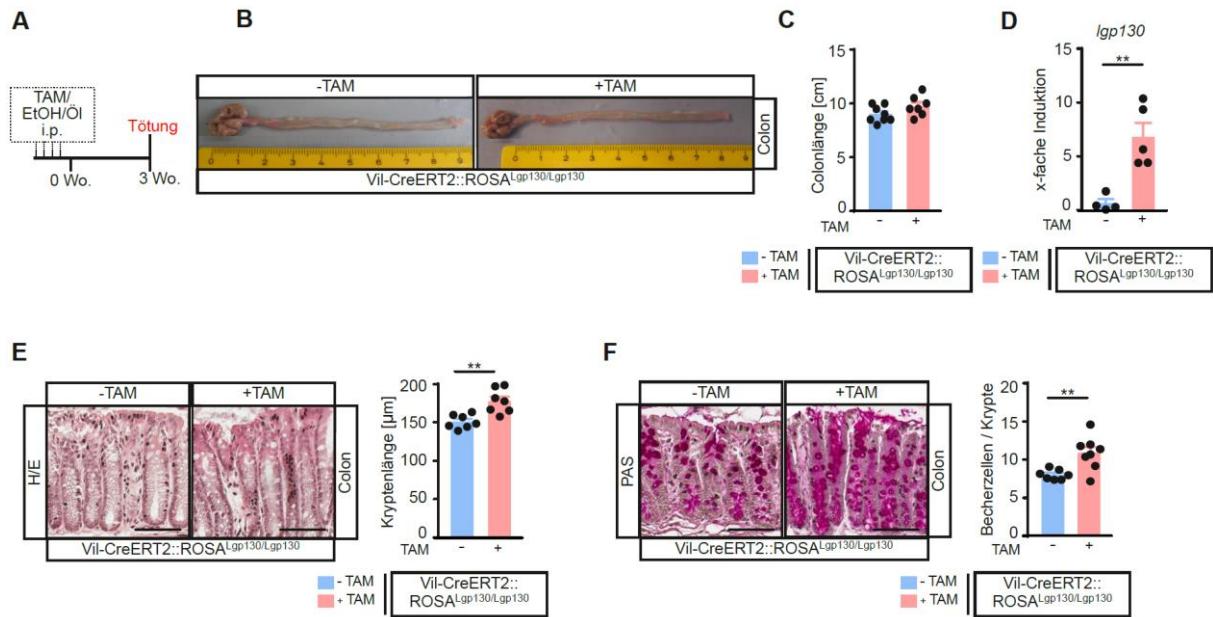


Abb. 4.17: Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse zeigen nach Induktion leicht veränderte Darmmorphologie. (A) Experimenteller Aufbau. (B) Repräsentative Bilder von Colons nach Lgp130 Aktivierung in Darmepithelzellen. (C) qRT-PCR der Colon-RNA zeigte erhöhte Lgp130-Expression bei synthetischer Lgp130-Aktivierung. (D) Mäuse mit Darmepithelzellen-spezifischer Lgp130 Aktivierung weisen keine veränderte Colonlänge auf. (E) Repräsentative Histochemie zeigte signifikant verlängerte Kryptenlänge und (F) signifikant erhöhte Anzahl von Becherzellen im Colon von Mäusen mit Darmepithel-spezifischer Lgp130 Aktivierung. Für die Quantifizierungen wurden mindestens 5 nicht überlappende Bilder pro Maus analysiert. Maßstabsbalken zeigen 250 µm (E, F). Daten sind Mittelwerte \pm SEM. n = 4-5 Mäuse / Gruppe (B). n = 7-8 Mäuse / Gruppe (C, D, E). **p <0.01. Student's t-Test (C-F).

Im Gegensatz zu Analysen der Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse (vgl. Abb. 4.3E) konnten wir bei Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen eine signifikante transkriptionelle Hochregulation der Akut-Phase-Proteine *Saa1* und erhöhte *Saa2* im Colon nachweisen (Abb. 4.18), was darauf schließen lässt, dass eine alleinige Lgp130 Expression in intestinalen Epithelzellen zur Induktion der Akut-Phase-Proteine SAA1 und SAA2 ausreichend ist.

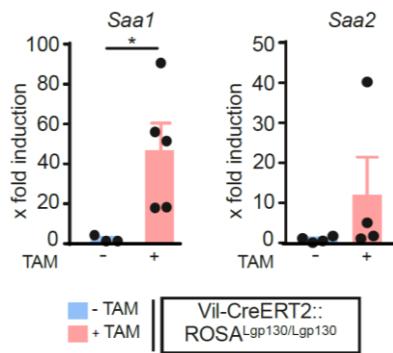


Abb. 4.18: Lgp130 Expression in intestinalen Epithelzellen führt zu erhöhten *Saa1* und *Saa2* Transkripten im Colon. qRT-PCR Analyse zeigte eine erhöhte Expression von *Saa1* und *Saa2* im Colon von Mäusen mit Darmepithelzellen-spezifischer Lgp130. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. n = 3-5 Mäuse / Gruppe. *p <0,05. Mann-Whitney-U-Test.

4.9 Lgp130 Aktivierung in intestinalen Epithelzellen führt zu geringerem Schweregrad bei einer DSS-Kolitis

Zur Analyse lokaler Erhöhung von SAA Proteinen im Darm und dessen Auswirkung auf eine Kolitis, exponierten wir Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse mit Lgp130 Expression in intestinalen Epithelzellen einer DSS-Kolitis. Nachdem Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse mit Tamoxifen oder Ethanol/Öl an vier aufeinander folgenden Tagen i. p. injiziert wurden, erhielten die Mäuse zur Induktion einer akuten DSS-Kolitis nach einer Karenzzeit von 7 Tagen 2 % DSS über das Trinkwasser (Abb. 4.19A). Tamoxifen-induzierte Mäuse mit Lgp130-Expression in intestinalen Epithelzellen zeigten einen signifikant erhöhten Gewichtsverlust zwischen Tag 2 und 9 im Gegensatz zu Kontrollmäusen. Sie regenerierten sich auch nach Beendigung des DSS-Zyklus nicht wieder auf das Gewichtsniveau der Kontrolltiere (Abb. 4.19B). Sowohl Tamoxifen-induzierte Mäuse, als auch Kontrollmäuse zeigten nach Induktion einer DSS-Kolitis im Vergleich zu Mäusen, welche keine DSS-Kolitis durchlaufen hatten, eine signifikant verkürzte Colonlänge (Daten nicht gezeigt). Hierbei konnten wir bei Mäusen mit Lgp130-Expression in intestinalen Epithelzellen jedoch eine signifikant verlängerte Colonlänge nach Induktion einer DSS-Kolitis im Vergleich zu Kontrolltieren beobachten (Abb. 4.19C). Tamoxifen-induzierte Mäuse und Kontrolltiere zeigten keine Unterschiede der Kryptenlänge bei H/E gefärbten Colonkrypten. Beide Mausgruppen wiesen jedoch großflächige Immun-Follikel auf (Abb. 4.19D). Darüber hinaus konnte kein Unterschied in der Anzahl von Becherzellen festgestellt werden (Abb. 4.19E). Trotz vermehrter Gewichtsreduktion weisen Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse eine

ähnliche Darmmorphologie wie Kontrolltiere auf, wobei die verlängerte Colonlänge auf einen verminderten Entzündungsgrad im Darm schließen lässt.

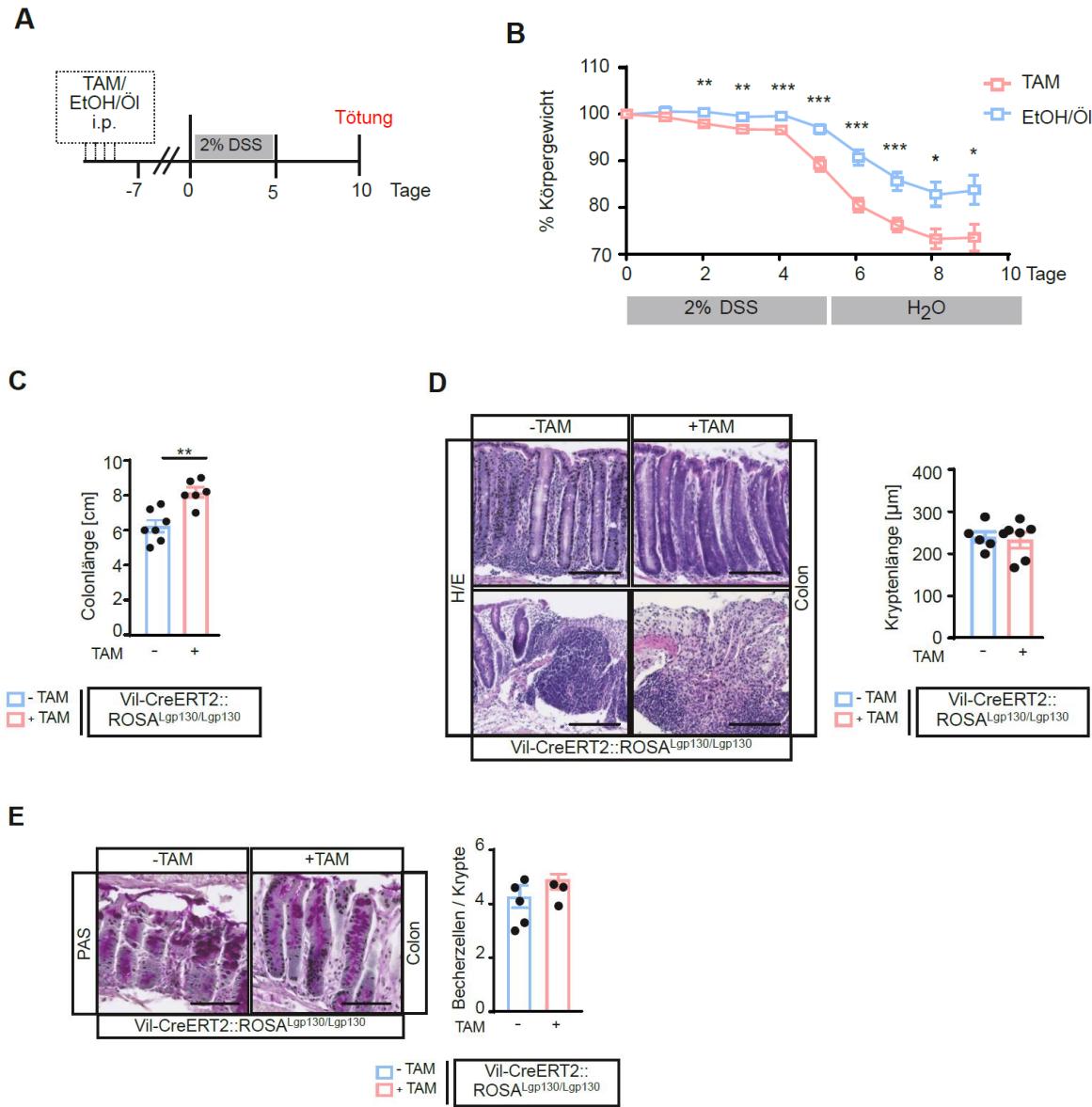


Abb. 4.19: Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse zeigen geringeren Schweregrad bei DSS-Kolitis trotz vermehrtem Gewichtsverlust. (A) Experimentelle Versuchsdurchführung der DSS-Kolitis. (B) Prozentuales Körpergewicht von Kontroll- und Lgp130 induzierten Mäusen über einen Zeitraum von 10 Tagen. Tamoxifen-induzierte Mäuse zeigten ein signifikant reduziertes Körpergewicht. (C) Mäuse mit Darmepithelzellen-spezifischer Lgp130 Aktivierung zeigten verlängerte Colonlänge nach Induktion einer DSS-Kolitis. (D) Unveränderte Kryptenlänge bei Mäusen mit Darmepithelzellen-spezifischer Lgp130 Aktivierung nach einer DSS-Kolitis. (E) Unveränderte Anzahl von Becherzellen nach einer DSS-Kolitis bei Tamoxifen induzierten Mäusen. Für die Quantifizierung wurden mindestens 5 nicht überlappende Bilder pro Maus analysiert. Maßstabsbalken zeigen 250 µm (E, D). Daten sind Mittelwerte ± SEM. n = 13 Mäuse / Gruppe (B). n = 6-7 Mäuse / Gruppe (C). n = 5 Mäuse / Gruppe (D, E). **p <0,01. Mann-Whitney-U Test (B). Student's t-Test (B-E).

In Studien mit UC-Patienten konnten erhöhte SAA-Werte mit einer erhöhten histologischen Entzündung und verstärkter klinischer Aktivität korreliert werden [237, 238]. Mäuse mit Lgp130-Expression in intestinalen Epithelzellen zeigten nach der Induktion einer DSS-Kolitis mehr SAA1/2-Ablagerungen in der Immunfluoreszenz im Darm als Kontrollmäuse (Abb. 4.20A). *Saa1* und *Saa2* Transkription war signifikant erhöht bei Lgp130-exprimierenden Mäusen (Abb. 4.20B). Dies lässt darauf schließen, dass eine lokale Erhöhung der Akut-Phase-Proteine SAA zur vermehrten Ablagerung im Colon ausreichend ist.

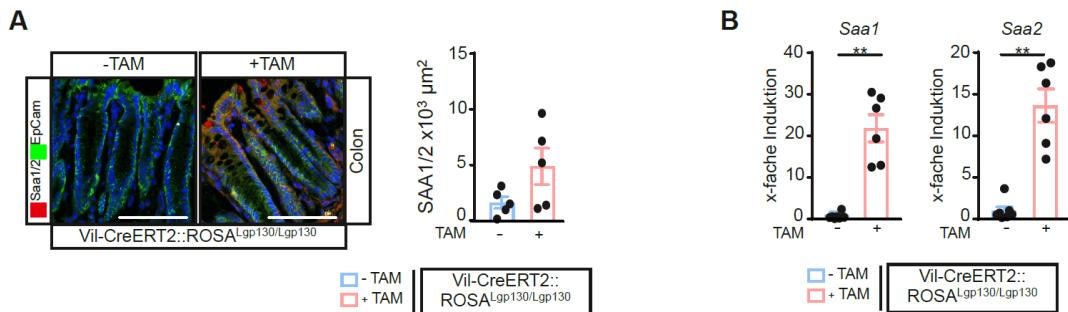


Abb. 4.20: Vermehrte SAA1/2 Ablagerungen im Colon bei Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen nach DSS-Kolitis. (A) Repräsentative Immunfluoreszenz zeigte vermehrte SAA1/2 im Colon nach einer DSS-Kolitis bei Mäusen mit Darmepithelzellen-spezifischer Lgp130 Aktivierung. (B) Transkriptionelle Erhöhung der Expression von *Saa1* oder *Saa2* im Colon von Tamoxifen-induzierten Mäusen. Für die Quantifizierung wurden mindestens 5 nicht überlappende Bilder pro Maus analysiert. Maßstabsbalken zeigen 100 µm (A). Daten sind Mittelwerte ± SEM. n = 5 Mäuse / Gruppe (A). n = 5-6 Mäuse / Gruppe (B). **p < 0,01. Student's t-Test (A). Mann-Whitney-U-Test (B).

4.10 Vermehrte Tumorinduktion nach einer AOM/DSS-Kolitis durch Lgp130 Aktivierung in intestinalen Epithelzellen

Um zu untersuchen, ob gp130-Aktivierung in intestinalen Epithelzellen und die damit assoziierte lokale Erhöhung an SAA-Proteinen eine Tumorbildung im Colon begünstigt, exponierten wir Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse einer AOM/DSS-Kolitis. Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse erhielten zunächst an vier aufeinander folgenden Tagen Injektionen mit Tamoxifen oder Ethanol/Ö. Zur Induktion einer AOM/DSS-Kolitis erhielten die Mäuse nach einer Karenzzeit von 7 Tagen eine Injektion von 10 mg/Kg Körpergewicht AOM. Dies löst DNA-Schäden in intestinalen Epithelzellen aus. Es folgten 3 Zyklen mit 1 % DSS über das Trinkwasser (Abb. 4.21A). Hierbei konnten wir bei Tamoxifen-induzierten Mäusen mit Lgp130-Expression in intestinalen Epithelzellen, ähnlich wie bei Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen (vgl. Abb. 4.13B) einen signifikant erhöhten Gewichtsverlust zwischen Tag 42 und 50, sowie eine signifikant schlechtere Erholung nach

Beendigung der DSS-Zyklen beobachten (Abb. 4.21B). Sowohl bei Lgp130-exprimierenden Mäusen, als auch bei Kontrollmäusen zeigten sich 100 Tage nach AOM-Injektion makroskopisch sichtbare Tumore (Abb. 4.21C). Es konnte keine Veränderung der Colonlänge zwischen Mäusen mit Lgp130-Expression und Kontrollmäusen nachgewiesen werden (Abb. 4.21D). Bei Lgp130-induzierten Mäusen konnte jedoch eine höhere Anzahl an Tumoren im Vergleich zu Kontrollmäusen dokumentiert werden (Abb. 4.21E). Dies lässt darauf schließen, dass die zellautonome und konstitutive gp130 Aktivierung in intestinalen Epithelzellen eine wesentliche Rolle bei der Tumorinduktion bei der entzündungs-assoziierten Karzinogenese einnimmt.

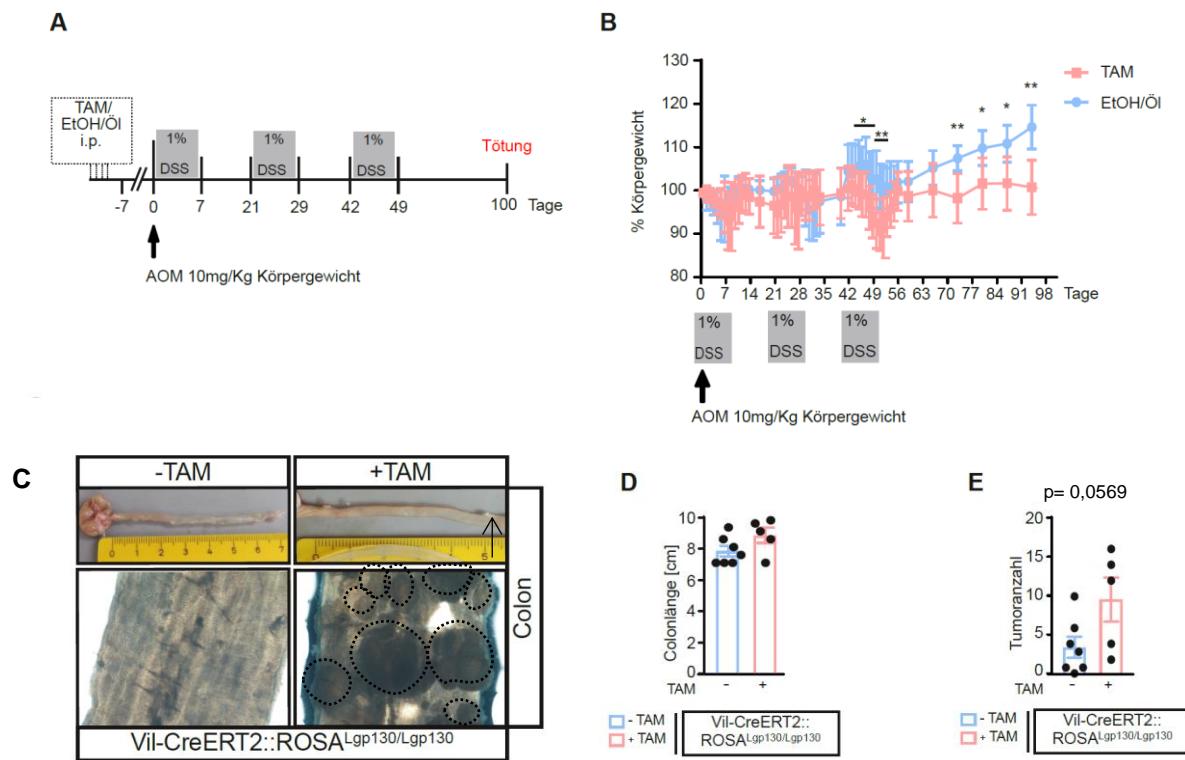


Abb. 4.21: Vermehrte Tumorinduktion bei Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen nach einer AOM/DSS-Kolitis. (A) Versuchsdurchführung der AOM/DSS-Kolitis. (B) Prozentuelles Körpergewicht von Kontroll- und Lgp130 induzierten Mäusen über einen Zeitraum von 100 Tagen. Tamoxifen-induzierte Mäuse zeigen ein signifikant reduziertes Körpergewicht. (C) Repräsentative Bilder von Colons von AOM/DSS-behandelten Mäusen. (D) Mäuse mit Darmepithelzellen-spezifischer Lgp130 Aktivierung haben keine veränderte Colonlänge. (E) Erhöhte Tumoranzahl im Colon von Tamoxifen-induzierten Mäusen. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. n = 10 Mäuse / Gruppe (B). n = 5-7 Mäuse / Gruppe (D, E). *p <0,05. Mann-Whitney-U-Test (A). Student's t-Test mit Welch's Correction (D). Student's t-Test (E).

Im Gegensatz zu den Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen mit systemischer Entzündungsreaktion zeigten Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse in histologischen Analysen eine signifikante Hyperplasie (Abb. 4.22A). Die relative Anzahl an Becherzellen war in Lgp130-exprimierenden Mäusen reduziert (Abb. 4.22B). Dies deutete darauf hin, dass die Darmbarriere und die intestinale Homöostase als Folge abgeschwächt sind und zur vermehrten Penetration der Darmbakterien führen.

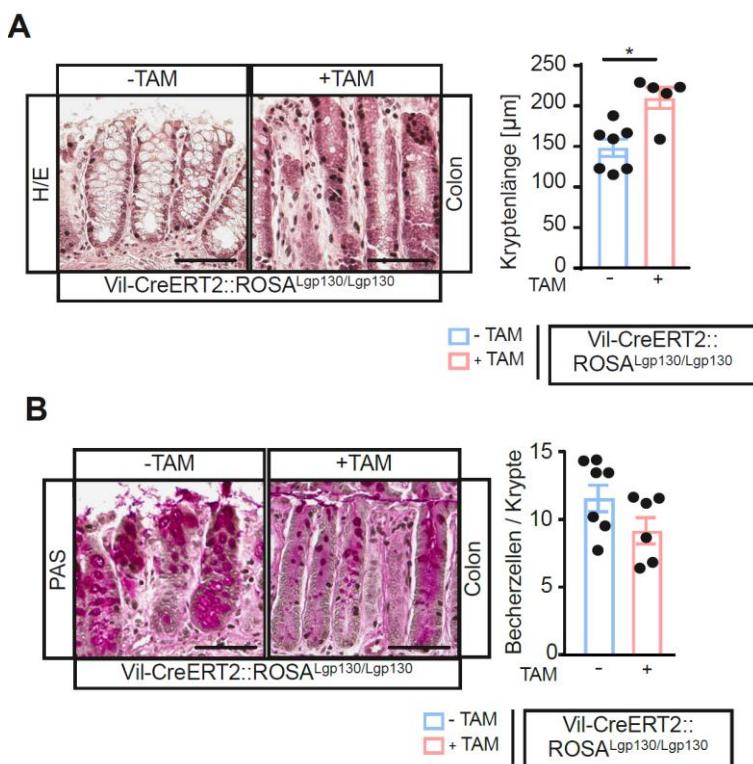


Abb. 4.22: Leichte Hyperplasie in Mäusen mit intestinaler Lgp130-Expression in einem chemische-induzierten Colon-Karzinom-Modell. (A) Repräsentative histochemische Färbungen zeigten Hyperplasie bei Mäusen mit Darmepithelzellen-spezifischer Lgp130 Aktivierung nach einer AOM/DSS-Kolitis. (B) Repräsentative Bilder zeigen verringerte Anzahl von Becherzellen nach einer AOM/DSS-Kolitis bei Mäusen mit Lgp130-Expression in Darmepithelzellen. Für die Quantifizierung wurden mindestens 5 nicht überlappende Bilder pro Maus analysiert. Maßstabsbalken zeigen 250 μm (A, B). Daten sind Mittelwerte ± SEM. n = 5-7 Mäuse / Gruppe (A, B). *p <0,05. Mann-Whitney-U Test (A). Student's t-Test (B).

Wie bereits bei unbehandelten Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse zeigten Mäuse mit intestinaler Lgp130-Expression eine signifikante Erhöhung an *Saa1*-Transkripten, während *Saa2*-Transkripte nur leicht erhöht waren (Abb. 4.23A). Darüber hinaus zeigte sich allerdings kein Unterschied im SAA1/2-Plasmaspiegel zwischen Lgp130-exprimierenden Mäusen und Kontrollmäusen (Abb. 4.23A).

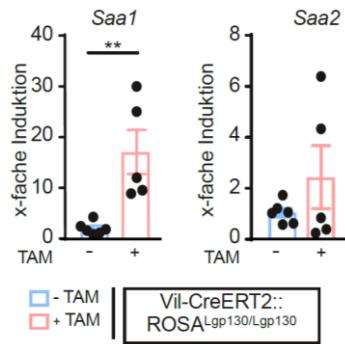


Abb. 4.23: Lgp130 Expression in Darmepithelzellen führt zu signifikant erhöhten *Saa1* und leicht erhöhten *Saa2* Expression nach einer AOM/DSS-Kolitis. qRT-PCR zeigte erhöhte Expression von *Saa1* oder *Saa2* im Colon von Tamoxifen-induzierten Mäusen. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. n = 5-6 Mäuse / Gruppe. **p < 0,01. Mann-Whitney-U Test.

5 Diskussion

Mitglieder der IL-6 Zytokinfamilie signalisieren über die signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit gp130, wobei sie dabei an verschiedenen Prozessen in der Leber und dem Darm beteiligt sind [66, 93]. Verschiedene hepatische Zelltypen können dabei direkt auf IL-6 ansprechen, womit es schwierig ist einem einzelnen Zelltypen einen biologischen Beitrag z.B. zur Induktion der Akut-Phase-Proteine zuzuschreiben. Darüber hinaus sind auch die Auswirkungen der Akut-Phase-Proteine bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und entzündungsbedingten Darmtumoren weitestgehend unbekannt. Deshalb haben wir in unserem Labor neuartige Mausmodelle generiert, die uns eine zelltypspezifische Aktivierung von gp130 erlauben und uns eine Analyse von Leber- und Darmentzündung und Tumorbildung bei zellautonomer- und zelltypspezifischer Aktivierung von gp130 [98] in Hepatozyten und intestinalen Epithelzellen ermöglicht.

5.1 Konstitutiv aktive gp130 Aktivierung in Hepatozyten als Modell für sterile Infektion und systemische Entzündungen

Während einer chronisch entzündlichen Erkrankung ist IL-6 systemisch erhöht. Dies führt zu einer Aktivierung verschiedener hepatischer Zelltypen und einer persistenten Erhöhung der Akut-Phase-Proteine. Zur Analyse des biologischen Beitrags von Hepatozyten zur Induktion der Akut-Phase-Proteine, wurde das Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mausmodell mit modifizierter konstitutiv aktiver und ligandenunabhängiger gp130-Variante „Lgp130“ verwendet [98]. Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse zeigten Expression von Lgp130 über das Leberparenchym verteilt und das Vorhandensein des Reporterkonstrukts ZsGreen (Abb. 4.1C). Trotz der Hochregulierung von SOCS3 (Abb. 4.1F) fand eine stabile Aktivierung des JAK/STAT Signalweges statt (Abb. 4.1D-E). Somit scheint eine SOCS3 Aktivierung nicht ausreichend zur Hemmung der katalytischen Aktivität der JAKs zu sein. Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse stellen daher ein geeignetes Modell zur Analyse zellautonomer- und zelltypspezifischer Aktivierung von gp130 in Hepatozyten dar.

Die Akut-Phase-Reaktion stellt eine systemische Erstreaktion auf lokale und systemische Schädigungen dar [120, 121], wobei insbesondere das IL-6/gp130 Signalmodul in Hepatozyten für die Produktion der Akut-Phase-Proteine in der Leber verantwortlich ist [121]. Die zellautonome Lgp130 Aktivierung in primären Hepatozyten führte zu einer Aktivierung von Akut-Phase-Proteinen, aber auch von Proteinen der angeborenen

Immunabwehr wie z.B. den Komplementkomponenten C3, das Fettsäurebindungsprotein *Fatty acid binding protein* (Fabp) 1 und das Proteoglykan *Proteoglycan 4* (Prg4) (Abb. 4.2D-E).

Das Akut-Phase-Protein Alpha-1-antitrypsin (Serpina1), ein Inhibitor der von Neutrophilen stammenden Serinproteasen wie neutrophile Elastase und der Proteinase-3 [246], gehört zu den positiven Akut-Phase-Proteinen und ist in der Akut-Phase-Reaktion erhöht. Die Aktivierung von Akut-Phase-Proteinen spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von Entzündungsreaktionen und der angeborenen Immunantwort. Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse zeigten als Folge der Lgp130 Aktivierung in Hepatozyten eine vermehrte Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Leber von jungen (Abb. 4.4B) und alten Mäusen (Abb. 4.7B). Den Akut-Phase-Proteinen SAA und CXCL1 konnte bereits eine Schlüsselrolle bei der Rekrutierung und Mobilisierung von myeloiden Zellen nachgewiesen werden [247]. Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung wiesen erhöhte CXCL1-Expression in der Leber auf (Abb. 4.4A). Dies steht im Einklang mit früheren Erkenntnissen, wonach die Induktion der hepatischen CXCL1-Expression und die Mobilisierung von CD11⁺ und Gr1⁺ myeloiden Zellen unter septischen Bedingungen bei Mäusen mit hepatozytärem gp130-Mangel abgeschwächt ist [247]. Wir konnten jedoch keine CXCL1-Expression in isolierten Lgp130-exprimierenden Hepatozyten aufzeigen (Abb. 4.2F). Dies deutet darauf hin, dass parakrine Faktoren, welche von Lgp130-induzierten Hepatozyten sezerniert werden, die CXCL1-Expression in anderen Leberzelltypen induzieren. SAA-Proteine signalisieren über die TLR2 und -4 [139, 140]. Studien zeigten, dass sowohl TLR2-, als auch TLR4-Aktivierung auf Sternzellen die Expression von CXCL1 in Sternzellen und die Rekrutierung myeloider Zellen induzieren [248-250]. Dies lässt ein SAA-vermitteltes Zusammenspiel zwischen Hepatozyten und Sternzellen vermuten.

Die Mobilisierung und Infiltration von neutrophilen Granulozyten ist eine frühe Reaktion auf Gewebeschäden, systemische Entzündungen und Bakterien. Nach der Freisetzung aus dem Knochenmark zirkulieren Neutrophile in den Blutgefäßen, bevor sie in periphere Gewebe extravasieren [251]. Sie wandern zu Entzündungsprozessen, indem sie Chemokin-Gradienten folgen [252] und setzen dort zahlreiche pro- und anti-inflammatorische Zytokine wie z.B. IL-6 und IL-10, CXC- und CC-Chemokine und angiogene Faktoren frei [253]. Neutrophile Granulozyten können jedoch auch degranulieren und setzen dabei Substanzen wie Proteasen und antimikrobielle Proteine frei [254, 255]. Diese können auch gesundes Gewebe schädigen.

SerpinA1 begrenzt die durch aktivierte neutrophile Granulozyten und ihr Enzym Elastase verursachten Schäden und die Schädigung des Gewebes durch Proteasen am Ort der Entzündung [256, 257]. Primäre Hepatozyten von Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen zeigten jedoch eine signifikante Herabregulierung von SerpinA1 in isolierten Hepatozyten mit Lgp130-Expression (Abb. 4.2E). Auch im Gesamtleberprotein, sowie bei Gesamtleber-Transkriptomdaten zeigten Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse eine signifikante Reduktion von SerpinA1 (Daten nicht gezeigt). Patienten mit der Erbkrankheit „Serpina1-Mangel“ zeigten bei Entzündungen einen schweren Gewebezerfall, welcher zu Lungen- und Lebererkrankungen und in schweren Fällen zur Leberzirrhose führen kann [258, 259]. Trotz der signifikanten Herabregulierung zeigten sowohl junge, als auch gealterte Mäuse weder morphologische Veränderungen noch Schädigungen in der Leber (Abb. 4.1C und Abb. 4.5A-C). Eine Herabregulierung des SerpinA1-Spiegels um ca. 40% scheint somit keine physiologischen Auswirkungen bei einer Lgp130 Aktivierung in Hepatozyten zu haben, was sich in Folge einer Infektion jedoch ändern könnte. Darüber hinaus scheint der verringerte SerpinA1-Spiegel ausreichend zu sein, die durch neutrophile Granulozyten verursachten Schädigungen des Gewebes zu begrenzen, obwohl die Anzahl der Neutrophilen signifikant erhöht waren. Die hepatisch erhöhte Transkription der Akut-Phase-Proteine ist mit einer Abnahme der Synthese negativer Akut-Phase-Proteine wie Albumin verbunden (Abb. 4.2E) [1, 30, 124], was die Aminosäuren, welche für die Synthese positiver Akut-Phase-Proteine zur Verfügung stehen, erhöht [123, 125].

In primären Hepatozyten von Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen konnte eine signifikante Hochregulierung des Komplementkomponenten C3 gezeigt werden (Abb. 4.2D). Das Komplementsystem ist eine biochemische Kaskade von mehr als 35 Proteinen und spielt eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunabwehr gegen verschiedene Krankheitserreger durch Zytolyse, Chemotaxis und Opsonisierung. Darüber hinaus kann das Komplementsystem die Aktivierung von Mastzellen beeinflussen [260]. Der Komplementkomponent C3 hat neben seinen opsonierenden Eigenschaften auch eine wichtige Rolle bei der Initialisierungsphase der Leberregeneration und Leberzellproliferation spielt [261]. Er ist hierbei an der frühen Wachstumsreaktion regenerierender Hepatozyten beteiligt, indem er die Aktivierung von Priming-Signalen wie STAT3 und NF-κB vermittelt. Diese stellen wesentliche Faktoren für die Einleitung der Regenerationsreaktion dar [262]. Die Zytokine werden dabei hauptsächlich von nahe gelegenen Lebermakrophagen produziert, die durch Komplement-Effektorproteine aktiviert werden [263]. Komplementmangel bei Mäusen konnte bereits mit einer Beeinträchtigung der Leberregeneration in Verbindung gebracht

werden [264], wobei insbesondere C3-defiziente Mäuse eine deutlich verringerte DNA-Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren NF-κB und STAT3 in Leberkernextrakten und eine verminderte Wachstumsreaktion regenerierender Hepatozyten zeigten [261]. Dies lässt vermuten, dass Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse eine verbesserte Leberregeneration und Hepatozytenregeneration aufweisen als Kontrolltiere.

Neben den Akut-Phase-Proteinen sezernierten primäre Hepatozyten mit gp130-Aktivierung auch eine Vielzahl von Proteinen, welche eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunabwehr spielen wie z.B. das Fettsäurebindungsprotein Fabp1 und das Proteoglykan *Prg4*. Das Fettsäurebindungsprotein *Fatty acid binding protein* (Fabp) 1, welches eine wichtige Rolle bei dem intrazellulären Transport von langketigen Fettsäuren hat und bei der Lipoprotein-vermittelten Cholesterinaufnahme in Hepatozyten beteiligt ist [265], war sowohl in primären Hepatozyten von Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen (Abb. 4.2E), als auch in Gesamtleber Transkriptom- und Proteomanalysen herunterreguliert (Daten nicht gezeigt). Bei diesen Mäusen beobachteten wir zudem einen erhöhten Plasmaspiegel von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL), während die Plasmaspiegel von Lipoproteinen hoher Dichte (HDL), Triglyceriden und Cholesterin unverändert waren (Daten nicht gezeigt). Das Körper- und Lebergewicht der Lgp130-induzierten Mäuse veränderte sich trotz der Veränderungen im Lipidstoffwechsel und im Fettstoffwechsel nicht gegenüber den Kontrolltieren (Daten nicht gezeigt). Mögliche organismische Auswirkung des veränderten Lipid- und Fettstoffwechsels könnten in weitergehenden Studien analysiert werden.

Eine Veränderung des Lipid- und Fettstoffwechsels bei Krebserkrankungen wird als Tumorkachexie bezeichnet. Die Tumorkachexie ist ein multifaktorielles Syndrom mit fortschreitendem Verlust von Skelettmuskulatur, Fettgewebe und einem Gewichtsverlust von > 5% bis 10% in einem Zeitraum von 3-6 Monaten [266, 267]. Hierbei sind vor allem ein gesteigerter Proteinkatabolismus, negative Protein- und Lipidbilanzen sowie eine systemische Entzündung wichtige Komponenten [268, 269]. Insbesondere IL-6 konnte eine Relevanz bei der Entwicklung von Kachexie, dem Verlust von Fettgewebe bei Krebspatienten [270] und der direkten Stimulierung der Lipolyse in Verbindung gebracht werden [271]. Die gesteigerte Lipolyse wurde bereits als Hauptursache für den Verlust von Fettgewebe bei Tumorerkrankungen beschrieben [272-275]. IL-6 verursacht hierbei über die Aktivierung von Adenosin-Monophosphat-Kinase (AMPK) die Mobilisierung von Fettgewebe, welches nachfolgend das Enzym Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL) aktiviert [276-278]. Dieses ist für den Abbau von Lipiden verantwortlich, was auf einen direkten Einfluss von IL-6 auf

Adipozyten schließen lässt [279]. Das etablierte Colon-26-Karzinom (C26) Kachexie-Mausmodell, bei dem Mäusen ektopisch ein C-26 Kolonkarzinom implantiert wurde, führte zu hohen systemischen IL-6 Spiegeln. In Folge einer Hemmung der IL-6 Signalübertragungen wurde die Entwicklung von Schlüsselparametern der Kachexie wie Muskel- und Fettschwund, sowie Hypoglykämie bei tumortragenden Mäusen deutlich unterdrückt [280, 281].

Das Proteoglykan *Proteoglycan 4 (Prg4)* oder auch Megakaryozyten-stimulierender Faktor, welches eine wichtige Rolle bei der zellulären Aufnahme von Lipiden aus dem Blutkreislauf [282, 283] und der Beseitigung von Lipoproteinresten in der Leber spielt [284, 285], war in primären Hepatozyten von Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen signifikant hochreguliert (Abb. 4.2D). Prg4 signalisiert direkt als Ligand über die TLR2 und -4 und interagiert mit CD44 auf synovialen Fibroblasten, welche die Produktion einer Reihe entzündungsfördernder Mediatoren unterdrücken und die Fibroblastenproliferation verringert [286-288]. Prg4 ist zudem, ebenso wie IL-6, ein potenter Stimulator der Megakaryopoese [13, 289], was auf eine vermehrte Megakaryozytenpoese und -differenzierung bei Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen hindeuten könnte. Zur Analyse der Megakaryozyten-Reifung im Knochenmark könnte in weiterführenden Studien die Anzahl an Thrombozyten im Blut von Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen quantifiziert werden.

Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine robuste Aktivierung der Akut-Phase-Reaktion und der angeborenen Immunantwort bei zellautonomer Lgp130 Aktivierung in primären Hepatozyten in Abwesenheit von bakteriellen Infektionen oder Leberschädigungen hin. Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse stellen daher ein geeignetes Modell zur Analyse der Auswirkung von Akut-Phase-Proteinen auf patho-biologische Prozesse bei zellautonomer Aktivierung von gp130 in Hepatozyten dar.

Auch in der Gesamtleber und im Serum führte die Lgp130 Aktivierung in Hepatozyten zu einer Hochregulation von *Saa1* und *Saa2* (Abb. 4.3A-C). Hierbei zeigte sich, dass die SAA-Konzentration im Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mausmodell höher ist als in transgenen SAA-Mäusen [290, 291], aber mit SAA-Spiegeln in Mäusen mit bakterieller Infektion vergleichbar waren [227].

Die Akut-Phase SAA-Proteine interagieren mit einer Vielzahl von Rezeptoren. Hauptsächlich signalisiert SAA über den *N-formyl peptide receptor 2 (FPR2)*-Rezeptor [292], TLR2 und -4 [139, 140], sowie den *scavenger receptor class B type I (SR-BI)* und CD36 [143, 293]. Aber auch weitere Rezeptoren wie der ATP-Rezeptor P2X7 [144] oder auch der *receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)* [294] wurden in Studien als Rezeptor für SAA

nachgewiesen. Die SAA-Rezeptoren werden von einem breiten Spektrum von Zelltypen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Ursprungs exprimiert, was die Komplexität der biologischen Wirkung von SAA verdeutlicht [136]. Durch die Aktivierung von FPR2 aufgrund der Stimulation mit SAA wird der Transkriptionsfaktor NF-κB aktiviert und das pro-inflammatorische Zytokin IL-8 (menschliches Analog zum Chemokin CXCL1 in der Maus) von Neutrophilen sekretiert. Darüber hinaus werden die mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK und p38 aktiviert [248]. Die Stimulation von FPR2 durch SAA führt zu einer verlängerten Lebensdauer von Neutrophilen, indem SAA die konstitutive Apoptose verzögert [295]. Neben FPR2 signalisiert SAA über die TLR2 und -4 [139, 140], wobei eine Studie das TLR2/1 Heterodimer als den bevorzugten Rezeptor für SAA identifizierte [139]. Die Stimulation der TLR2 und -4 durch SAA führt zu einer *myeloid differentiation primary response protein* MyD88 (MyD88)-abhängigen Signalübertragung, einschließlich der Phosphorylierung von ERK und p38 MAP-Kinasen. Darüber hinaus führt sie zu einer Transkriptionsaktivierung, die eine Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1β zur Folge hat [139]. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zeigten Studien eine MyD88 anhängige TLR2 vermittelte CXCL1-Produktion in Hepatozyten und hepatischen Sternzellen, wobei CXCL1 die Infiltration von Neutrophilen in die Leber förderte [249]. Darüber hinaus konnte ein Beitrag der Aktivierung von TLR2 zur SAA-induzierten Expression von M2-Makrophagenmarkern und der Makrophagen Efferozytose nachgewiesen werden [296]. Dies stimmt mit unseren Ergebnissen überein, wonach wir bei Mäusen mit Lgp130 Expression in Hepatozyten und einer signifikanten SAA-Induktion eine IL-10 sezernierende M2-Makrophagenpopulation im Gegensatz zu Kontrollmäusen aufzeigen konnten (Daten nicht gezeigt). Dies lässt auf eine TLR2-SAA vermittelte Induktion von M2-Makrophagen schließen. Zusätzlich konnten wir bei Mäusen mit Lgp130 Aktivierung in Hepatozyten auch eine IL-6 sezernierende Makrophagenpopulation beobachten. Bei Kontrolltieren konnte hingegen nur eine einzige Kupffer-Zell-Population nachgewiesen werden, welche weder IL-6 noch IL-10 produzierte (Daten nicht gezeigt). Studien zeigten bereits, dass pro-inflammatorische myeloide Zellen in der Leber bei Abwesenheit von Gewebeschäden einen restaurativen Phänotyp einnehmen [297]. Diese Makrophagenpopulation stammt aus rekrutierten Lymphozyten-Antigen-6-Komplex, Locus C (Ly6C)+ Monozyten. Die Hauptaufgabe von restaurativen Makrophagen besteht in der Beseitigung von Leberschäden und Fibrose. Sie stellen die maßgebliche Matrix-Metallopeptidase (MMP)-exprimierende Untergruppe dar, wobei MMPs in Folge von Leberschäden hochreguliert und pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine herunterreguliert werden. Gleichzeitig findet eine

verstärkte Expression von Genen mit entzündungshemmenden und anti-fibrotischen Wirkungen statt [297, 298]. Dies lässt darauf schließen, dass in Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen als Folge der Lgp130 Aktivierung in Hepatozyten und der hohen Konzentrationen von Akut-Phase-Proteinen zwei verschiedene Makrophagenpopulationen aktiviert werden bzw. sich so entwickeln.

Neben einer erhöhten Anzahl von Granulozyten und CD11b⁺- infiltrierenden myeloiden Zellen (Abb. 4.4B) konnte eine signifikant gesteigerte Anzahl an CLEC4F⁺ Kupffer-Zellen in der Leber von Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen beobachtet werden (Abb. 4.4B). Die chemotaktische Aktivität von Phagozyten konnte *in vitro* bereits mit rekombinanten humanen SAA und isolierten Blutneutrophilen nachgewiesen werden [147]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Migration dieser Zellen durch die Aktivierung von SAA über den FPR2-Rezeptor auf Neutrophilen und Phagozyten vermittelt wird [141, 299]. Dies lässt darauf schließen, dass die zellautonome gp130 Aktivierung in Hepatozyten und die Sekretion von Akut-Phase-Proteinen zu einer erhöhten Proliferation und verstärkten Kupffer-Zell-Phagozytose führt, welche über eine SAA-FPR2-Achse vermittelt wird.

SR-BI und CD36 interagieren ebenfalls mit SAA [143, 293]. Die funktionelle Folge dieser Interaktion ist der Ausstrom von Cholesterin aus peripheren Geweben [145]. SR-BI/CLA-1 transduzieren bei Bindung an SAA Signale, welche zu einer ERK- und p38 MAP-Kinasen Phosphorylierung führen [147]. Der ATP-Rezeptor P2X7 wurde in Studien ebenfalls als SAA-Rezeptor identifiziert. Der P2X7-Rezeptor ist hierbei sowohl für die NLRP3-Inflammasom Aktivierung verantwortlich [144], als auch an der anti-apoptotischen Wirkung von Neutrophilen beteiligt [300]. Der RAGE-Rezeptor ist ein Transmembran-Multiligandenrezeptor der Immunglobulin-Superfamilie [294]. Die RAGE-Signalübertragung ist an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB beteiligt und induziert proinflammatorische Zytokine [301].

Die Leber wird durch Hepatozytenproliferation ständig erneuert [302]. Auch 60 Wochen nach Induktion konnte in unserem Mausmodell eine Hepatozyten-spezifische Lgp130 Aktivierung nachgewiesen werden (Abb. 4.5A). Studien konnten in Mäusen bereits zeigen, dass während der homöostatischen Erneuerung neue Hepatozyten durch die Replikation bereits vorhandener Hepatozyten entstehen [303, 304], sodass auch in diesen Zellen die Rekombination der Lgp130-Expressionskassette stattfindet.

Aktivierende gp130-Mutanten durch somatische In-Frame Deletionen wurden in Menschen mit entzündlichen hepatozellulären Adenomen in Verbindung gebracht werden [50]. Darüber hinaus konnte gp130 in Mäusen mit Hepatozyten-spezifischen gp130 Knockout als Treiber der HCC-Progression identifiziert werden [305]. In Mäusen mit Lgp130-Expression in B-Zellen konnten B-Zell-Lymphome und Plasmozytome aufgezeigt werden [306]. Allerdings konnten wir bei unseren Mäusen mit anhaltender LGP130-Expression in Hepatozyten keine Anzeichen von Tumorbildung nachweisen (Abb. 4.5B-C). Bei entzündlichen hepatozellulären Adenomen (*inflammatory hepatocellular adenomas*, IHCA) zeigte sich bei etwa 60 % der IHCA Patienten in-Frame-Deletionen in gp130, wobei die Deletionen in der IL-6 Bindungsstelle in Domäne 2 lagen. Dies hatte eine Aktivierung von STAT3 in Abwesenheit des Liganden zur Folge. Obwohl der Anteil der Patienten mit gp130 Mutationen in der Studie mit IHCA-Patienten sehr gering war, waren die gp130-Mutationen in diesen Fällen von zusätzlichen aktivierenden Mutationen im β -Catenin-Signalweg begleitet, was auf eine kooperative Wirkung dieser Signalwege für die maligne Transformation hindeutet. Gp130-mutierte IHCA ohne β -Catenin-Mutation ließen keine maligne Transformation erkennen [50]. Dies lässt darauf schließen, dass eine alleinige zellautonome konstitutiv aktive gp130-Aktivierung in Hepatozyten nicht zur Induktion von Lebertumoren ausreicht und eventuell sogar verhindert.

Patienten mit einer anhaltenden chronischen Erhöhung des Akut-Phase-Proteins SAA, weisen ein erhöhtes Risiko auf, eine Amyloidose zu entwickeln [150]. Bei der AA-Amyloidose führen extrazelluläre Ablagerungen des löslichen Akut-Phase Proteins in Form von unlöslichen Amyloidfibrillen zu Organschäden. In unserem Mausmodell mit anhaltender Lgp130-Expression in Hepatozyten konnten wir zeigen, dass eine anhaltende Erhöhung von SAA1 und 2 Amyloidablagerungen in peripheren Organen wie Darm, Niere und Milz zur Folge hat (Abb. 4.6A-C). Interessanterweise war hierbei auch die Anzahl myeloider Zellen in der Darmschleimhaut erhöht (Abb. 4.7B), was auf eine geringgradige Entzündung der peripheren Organe durch SAA Ablagerungen schließen lässt. Obwohl Studien aufzeigten, dass chronisch erhöhte SAA-Serumspiegel eine Voraussetzung zur Induktion einer Amyloidose sind, scheint eine alleinige SAA-Erhöhung nicht ausreichend zu sein. So entwickelten auch bei langjährigen und schweren entzündlichen rheumatischen Krankheiten nicht mehr als 10-30% der Patienten eine Amyloidose [307, 308], was neben erhöhten SAA-Serumspiegeln auf weitere Faktoren zur Pathogenese schließen lässt. In unserem Mausmodell mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression ist eine alleinige Erhöhung des Akut-Phase-Proteins zur Induktion von Amyloidablagerungen allerdings ausreichend, wobei eine lokale

entzündliche Mikroumgebung durch die SAA-Produktion zur Induktion einer Amyloidose beitragen könnte (Abb. 5.1) [309]. Weiterführende Studien mittels Elektronenmikroskopie des Gewebes könnten darüber Aufschluss geben, ob es sich bei den Amyloidablagerungen tatsächlich um Fibrillen handelt.

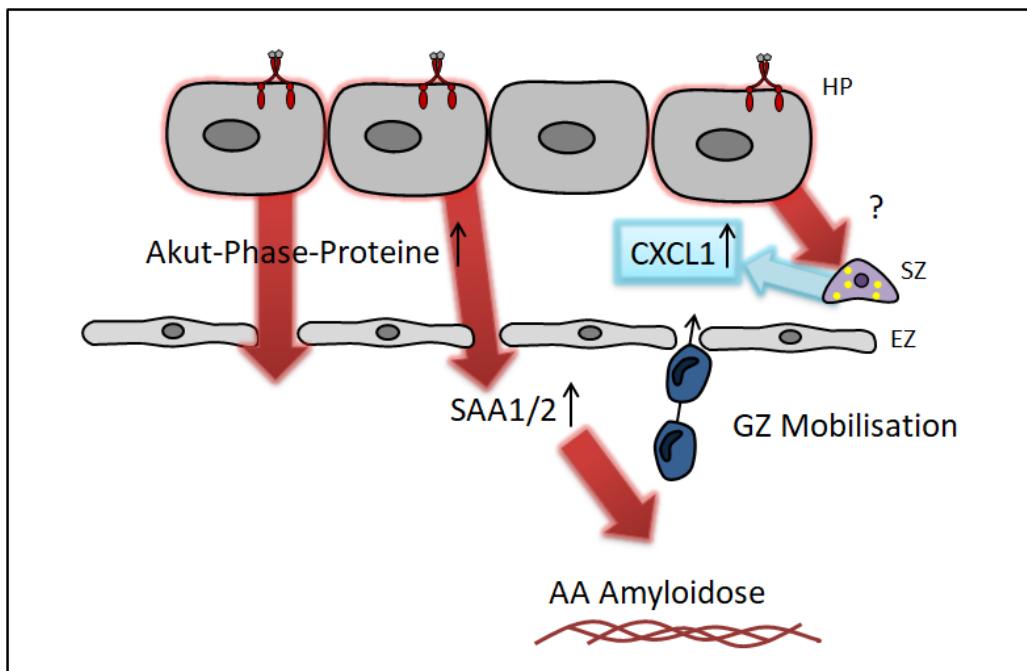


Abb. 5.1: Konstitutiv aktive gp130 Aktivierung in Hepatozyten löst Aktivierung der Akut-Phase-Reaktion und der robusten angeborenen Immunantwort aus. Lgp130 in Hepatozyten führt zur Erhöhung von Akut-Phase-Proteinen, insbesondere SAA1/2. Langanhaltende erhöhte SAA-Konzentration führt zur AA Amyloidose. Rekrutierung von Granulozyten durch parakrine Signale wie SAA1/2 und CXCL1. HP = Hepatozyt, SZ = Sternzelle, EZ = Endothelzelle, GZ = Granulozyt.

Junge Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen zeigten trotz SAA-Ablagerungen im Darm (Abb. 4.3D) eine unveränderte Darmmorphologie, eine unveränderte physiologische Differenzierung von sekretorischen Zellen wie Becherzellen und eine gleichbleibende Anzahl proliferativ aktiver Zellen, gemessen an der Ki67-Präsenz (Abb. 4.8A-E). Dies deutet darauf hin, dass eine alleinige konstitutive Aktivierung durch Lgp130 in Hepatozyten trotz signifikanter Amyloidablagerungen und inflammatorischen myeloiden Zellen keinen Einfluss innerhalb der Krypten-Darm-Einheit hat.

Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse zeigten signifikant erhöhte IL-6 und IL-23 Zytokinspiegel in Colonlysaten (Abb. 4.9A). Das Zytokin IL-6 wurde bereits als T-Zell-Aktivierungsfaktor beschrieben. Es reguliert die Differenzierung spezifischer CD4⁺ T-Zell-

Untergruppen und das Überleben von T-Zellen durch die Aufrechterhaltung von anti-apoptotischen Faktoren [19, 34, 310]. IL-6 wurde bereits mit der Pathologie der Darmentzündungen in Verbindung gebracht. So führte eine Blockade des IL-6 Trans-Signalings bei Mäusen zu einer T-Zell-Apoptose im Dickdarm. Dies hatte eine Krankheitslinderung zur Folge, da eine erhöhte T-Zell Resistenz gegen Apoptose fördernd auf den Krankheitsverlauf von Morbus Crohn wirken kann [34, 311]. Bei der Differenzierung von T_{H17} -Zellen spielt IL-6 eine entscheidende Rolle. Zusammen mit TGF β induziert IL-6 die Differenzierung naiver CD4 $^{+}$ T-Zellen in IL-17 sekretierende T_{H17} -Zellen [21, 23, 170]. Aktuelle Studien zeigten, dass SAA-Proteine in Kombination mit IL-6 die Differenzierung von naiven T-Zellen zu pathogenen IL-17 produzierenden T_{H17} -Zellen unabhängig von TGF β induzieren können. Zusätzlich konnte bei induzierbaren SAA1-Knock-in-Mäusen eine erhöhte Anzahl von ROR γ t $^{+}$ T_{H17} -Zellen in den Lymphknoten gefunden werden [26], wobei erhöhte IL-6 und IL-23 Produktion durch dendritische Zellen in der Lamina propria ebenfalls zur Differenzierung pathogener T_{H17} -Zellen führen können [26, 170]. So zeigten Studien, dass die Entwicklung von T_{H17} -Zellen in IL-23R-defizienten Mäusen in einer frühen Phase unterdrückt wird [312]. IL-23 hat hierbei eine stabilisierende Eigenschaft bei T_{H17} -Zellen. Die Expression des IL-23R und IL-17 wird durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT3 und ROR γ t durch IL-23 erhöht. Somit kommt es zu einem positiven *feed-forward loop* und zur Stabilisierung der T_{H17} -Zellen [313, 314]. In Colonlysaten von Kontrolltieren und Alb-CreERT $^{2::}$ ROSA $^{Lgp130/Lgp130}$ Mäusen konnten jedoch nur sehr geringe IL-17 Zytokinspiegel nachgewiesen werden (Abb. 4.9A), was entweder auf die limitierende Detektionsmethode oder auf das Nichtvorhandensein von IL-17 zurückzuführen sein wird. Hier könnten zukünftige Studien helfen, mittels Isolation von primären Zellen der Lamina propria von Alb-CreERT $^{2::}$ ROSA $^{Lgp130/Lgp130}$ Mäusen und einer anschließenden Analyse per Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting FACS*) sensitivere Zytokinspiegel von IL-17 messen.

Das Zytokin IL-23 hat neben der Differenzierung von T_{H17} -Zellen auch eine wichtige Rolle bei der Immunität gegen Krankheitserreger und der Autoimmunität. IL-23 wird u.a. von aktivierten pro-inflammatorischen Typ1-Makrophagen produziert, welche durch extra- und intrazelluläre Pathogene aktiviert werden [315]. *In vitro* Studien zeigten, dass SAA, welcher als endogener Ligand wirkt, die Sekretion von IL-23 durch die humane Monozyten-Zelllinie THP-1 und periphere Blutmonozyten stimuliert [316]. Darüber hinaus wird IL-23 von polarisierten T_{H1} -Zellen, Endothelzellen und aktivierten dendritischen Zellen, die aus peripheren Blutmonozyten stammen gebildet und sezerniert [317]. Dendritische Zellen

exprimieren auf ihrer Oberfläche verschiedene TLR. Die Stimulation des TLR2 führt zu einer erhöhten Synthese der α -Untereinheit von IL-23, des p19-Gens [318]. Die Co-Expression von p19 mit der β -Untereinheit von IL-12, p40, ergibt das funktionelle Zytokin IL-23. P19 wird jedoch nicht oder nur sehr schwach von murinen und humanen Zellen sezerniert, wobei in 293T-Zellen gezeigt werden konnte, dass bei einer Co-Expression von p19 und p40 eine erhöhte Sekretion von p19 stattfindet [317]. Die erhöhte Synthese von p19 führt somit zu einer gesteigerten Sekretion von IL-23 [318-320]. IL-23 kann die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α aus myeloiden Zellen auslösen [321], was die Sekretion zusätzlicher pro-inflammatorischer Mediatoren durch endotheliale und epitheliale Zellen stimuliert [322]. Die erhöhte IL-23 Zytokinkonzentration in Colonlysaten bei Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen lassen die Auslösung einer weiteren pro-inflammatorischen Kaskade im Darm vermuten, die, wenn sie über einen längeren Zeitraum unkontrolliert aufrechterhalten wird, eine Triebkraft für die Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sein kann. Dies würde mit unseren Ergebnissen übereinstimmen, wonach wir erhöhte IL-1 β Spiegel in Colonlysaten von Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Aktivierung nachweisen konnten (Abb. 4.9).

5.2 Konstitutiv aktive gp130 Aktivierung in intestinalen Epithelzellen als Modell für lokale SAA Erhöhung im Darm

Um den Einfluss zellautonomer Aktivierung von gp130 in intestinalen Epithelzellen zu analysieren, wurde das Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mausmodell verwendet. Nach Tamoxifen-Induktion exprimierten Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse konstitutiv aktives gp130 in intestinalen Epithelzellen (Abb. 4.17D). Die Colonlänge von Mäusen mit Lgp130 Expression in intestinalen Epithelzellen war unverändert und die Därme makroskopisch unauffällig (Abb. 4.17B-C). Darüber hinaus zeigten Tamoxifen-induzierte Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse eine signifikant gesteigerte Hyperplasie (Abb. 4.17E). Dies stimmt mit Analysen überein, wonach der Transkriptionsfaktor STAT3 für die Proliferation und Differenzierung in intestinalen Epithelzellen relevant ist. Studien zeigten bereits, dass die Aktivierung von STAT3 in intestinalen Epithelzellen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung und Verbesserung der epithelialen Barrierefunktion im Darmepithel zugesprochen werden kann, indem sie Tight-Junction-Proteine moduliert [323]. Dies stimmt mit unseren Ergebnissen überein, wonach Mäuse mit Lgp130 Expression eine signifikant gesteigerte Anzahl von Becherzellen aufwiesen (Abb. 4.17F). Becherzellen sezernieren

Muzine, insbesondere das Muzin 2, die das primäre Strukturelement der intestinalen Barrièreschicht zwischen Darmepithel und Darmflora darstellt [324]. Die konstitutive Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges führt somit zu einer vermehrten Regeneration und Proliferation von intestinalen Epithelzellen und einer damit verbundenen Hyperplasie.

Im Gegensatz zu Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen, welche keine transkriptionelle Hochregulierung der Akut-Phase-Gene *Saa1* und *Saa2* im Colon aufwiesen (Abb. 4.3E), konnten wir bei Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse eine signifikant erhöhte SAA Expressionen im Darm beobachten (Abb. 4.18A). Dies lässt auf eine lokale SAA-Produktion von intestinalen Epithelzellen in Folge der zellautonomen Aktivierung von gp130 schließen, während Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen eine systemische Hochregulierung von SAA zeigten. Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse stellen ein geeignetes Modell zur Analyse zellautonomer- und zelltypspezifischer Aktivierung von gp130 in intestinalen Epithelzellen bei lokaler SAA-Erhöhung im Darm dar (Abb. 5.2).

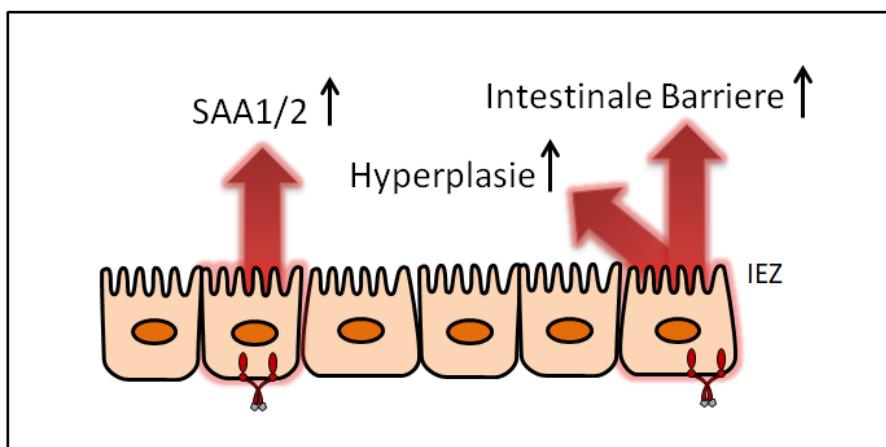


Abb. 5.2: Konstitutiv aktive gp130 Aktivierung in intestinalen Epithelzellen führt zu lokalen Entzündungsreaktionen im Darm. Lgp130 in intestinalen Epithelzellen führt zur Erhöhung des Akut-Phase-Proteins SAA1/2 und Hyperplasie von intestinalen Epithelzellen. Die intestinale Barriere wird gestärkt, was zu einer verringerten Infiltration von Immunzellen führt. Lgp130 in intestinalen Epithelzellen führt zu einer lokalen Erhöhung des Akut-Phase-Proteins SAA1/2 im Darm. IEZ = intestinale Epithelzelle.

5.3 Konstitutiv aktive gp130 Aktivierung in Hepatozyten und intestinalen Epithelzellen hat eine schützende Wirkung auf das Darmepithel bei einer DSS-Kolitis

Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen (*Inflammatory bowel disease*, IBD) sind durch permanente und lokale Entzündungen im Gastrointestinaltrakt gekennzeichnet, wobei erhöhte Konzentrationen an IL-6 im Serum bei Patienten detektiert werden können [62, 325, 326]. Das Zytokin IL-6 weist sowohl pro-inflammatorische, als auch regenerative Eigenschaften bei Darmentzündungen auf [54, 61]. So konnte IL-6 bereits eine regenerative Wirkung in intestinalen Epithelzellen durch erhöhte Proliferation und verringerte Apoptose nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte STAT3 eine wesentliche Rolle bei der Epithelproliferation und –regeneration zugeschrieben werden [59, 60]. In Darmlysaten von DSS-behandelten Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Expression war IL-6 nachweisbar, jedoch ohne signifikanten Unterschied zu Kontrollmäusen (Abb. 4.12A). IL-6 Knockout Mäuse zeigten bei einer DSS-induzierten Kolitis eine erhöhte Infiltration von Immunzellen, einen stärkeren Verlust der Kryptenstruktur und einen signifikant schlechteren Krankheitsverlauf [54], wohingegen Mäuse mit einer STAT3-aktivierenden Mutation im Kolitisversuch geschützt waren [327]. Studien zeigten, dass IL-Knockout Mäuse einen deutlich geringeren Gewichtsverlust nach einer DSS-Kolitis aufwiesen [54]. Dies korreliert mit unseren Ergebnissen, wonach wir einen signifikant erhöhten Gewichtsverlust sowohl bei Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen (Abb. 4.10B), als auch bei Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen (Abb. 4.19B) beobachten konnten.

Lgp130-Expression in Hepatozyten und in intestinalen Epithelzellen hatte nur einen geringen Effekt auf die intestinale Entzündung und die Kolitis. So konnten wir bei Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen außer einem verringerten Becherzellenverlust lediglich mildere Entzündungsreaktionen wie signifikant verringerte Hyperplasie und eine unveränderte Colonlänge im Vergleich zu Kontrolltieren beobachten (Abb. 4.10C-D). Im Vergleich hierzu zeigten Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse keine morphologischen Veränderungen, wobei die Colonlänge sogar im Vergleich zu Kontrolltieren weniger stark verringert war (Abb. 4.19C-E). Erhöhte STAT3-Signalübertragungen in Folge zellautonomer gp130 Aktivierung in Hepatozyten und intestinalen Epithelzellen kann somit das Ausmaß der Epithelschädigung und Entzündungen der Kolitis begrenzen [235], wobei die alleinige Aktivität nicht zur Heilung ausreichend ist.

Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse regenerierten sich im Gegensatz zu den Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen nach DSS-Gabe auf das Gewichtsniveau der

Kontrolltiere (Abb. 4.10B und Abb. 4.19B). Die verbesserte Regeneration der Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse ließ sich jedoch nicht auf vermehrte Proliferation intestinaler Epithelzellen zurückführen (Abb. 4.10F). Die fehlende Gewichtszunahme der Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse lässt auf eine Malabsorption von Nährstoffen schließen. Die Malabsorption steht im engen Zusammenhang mit Schleimhautveränderungen im Darm, wie z.B. einem gestörten Epitheltransport oder dem Verlust der Darmepithelintegrität [328]. Wir konnten jedoch bei Tamoxifen-induzierten Mäusen keine Veränderungen bezüglich eines Becherzellenverlustes, eines damit einhergehenden Verlustes der Dickdarmepithelintegrität, sowie eine Zerstörung der Mukosa beobachten (Abb. 4.19E). Studien zeigten, dass insbesondere das Ileum bei Patienten mit chronischen Darmentzündungen und ausgeprägten Entzündungsherden eine wichtige Rolle bei der Verringerung einer funktionsgerechten Nährstoffresorption spielt [329]. Der gestörte Ionentransport führt zu Elektrolyt- und Flüssigkeitsmangel, wobei spezifische Resorptionsstörungen bei Patienten mit chronischen Darmentzündungen auftreten können. Hierbei kann eine gestörte Gallensäurerückresorption aus dem entero-hepatischen Kreislauf zu hohen Konzentrationen von Gallensäure im Dickdarm führen. Nicht resorbierte Gallensäure stimuliert die Wasser- und Elektrolytsekretion des Dickdarms [330, 331]. Bei bakterieller Überwucherung des Dünndarms dekonjugieren die überschüssigen Bakterien die Gallensalze, was nicht konjugierte Gallensalze zur Folge hat. Diese sind nicht in der Lage Mizellen zu bilden, welche die Fettauflösung für die Absorption unterstützen [332, 333]. Dies führt zu einer Malabsorption von Fett und fettlöslichen Vitaminen wie Vitamin A, D, E und K [334]. Die bakterielle Überwucherung des Dünndarms, welche ein Kennzeichen von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist, kann darüber hinaus ebenso zu einer erhöhten Durchlässigkeit des Darms und verringerten Verdauung und Absorption führen. Die produzierten osmotisch aktiven Metaboliten können dabei zu Unwohlsein und Durchfall beitragen [335, 336]. Die fehlende Gewichtszunahme der Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse könnte in weiterführenden Studien mittels PAS-Färbungen des Dünndarms weiteren Aufschluss über Schleimhautveränderungen bringen. Insbesondere wäre hier ein eventueller Unterschied der Darmintegrität im Gegensatz zu den Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen interessant. Auch eine Untersuchung der Bakterienlast des Dünndarms könnte weiteren Aufschluss über die fehlende Gewichtszunahme der Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse liefern. Darüber hinaus könnte dies Aufschluss darüber geben, ob die bakterielle Überwucherung bei den

Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen trotz des regenerierten Gewichtsniveaus ebenso vorhanden ist.

Studien zeigten, dass erhöhte SAA-Werte im peripheren Blut von IBD Patienten mit einer histologisch aktiven Entzündung des Darms verbunden ist [240-242]. Zusätzlich wiesen Morbus-Crohn Patienten eine erhöhte intestinale Expression von *SAA1/2* in Darmsbiopsien auf [72]. Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse zeigten nach einer DSS-Kolitis signifikant erhöhte SAA-Serumkonzentration, während auf transkriptioneller Ebene im Darm kein Unterschied in der *Saa1* und *Saa2* Expression ersichtlich war (Abb. 4.11A-C). Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse wiesen hingegen signifikant erhöhte Transkripte der Akut-Phase-Proteine SAA1 und SAA2 im Colon auf (Abb. 4.20A-B). Dies lässt darauf schließen, dass Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse lediglich systemisch SAA bilden und dies nur langsam zu SAA-Ablagerungen im Darm führt. Hierbei scheint eine extrahepatische SAA-Produktion von intestinalen Epithelzellen nicht stattzufinden. Die Lgp130-Aktivierung scheint bei der Kolitis trotz einer erhöhten SAA-Induktion nur einen geringen Effekt zu haben. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit Analysen, wonach Mäuse, denen eine funktionelle SAA1/2 Expression fehlte, anfälliger für eine DSS-Kolitis waren [337].

Chronische Darmentzündungen sind durch die Zerstörung des Darmepithels und der Verlagerung von Bakterien in den portalen Kreislauf gekennzeichnet. Die intestinal-epitheliale SAA-Produktion und Sekretion spielt hierbei eine wichtige Rolle bei der Reduktion der bakteriellen Belastung translozierter Bakterien des Darms. Um die Ausbreitung translozierter Bakterien einzudämmen wird SAA in großen Mengen ausgeschüttet [337]. Dies lässt darauf schließen, dass lokales und systemisches SAA als ein Abwehrmechanismus gegen Darmbakterien wirkt und somit eine schützende Wirkung auf das Darmgewebe zur Folge hat. Erhöhte SAA-Expressionen haben somit einen leicht schützenden Effekte auf das Darmepithel bei Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen und Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen bei einer DSS-Kolitis hat (Abb. 5.3).

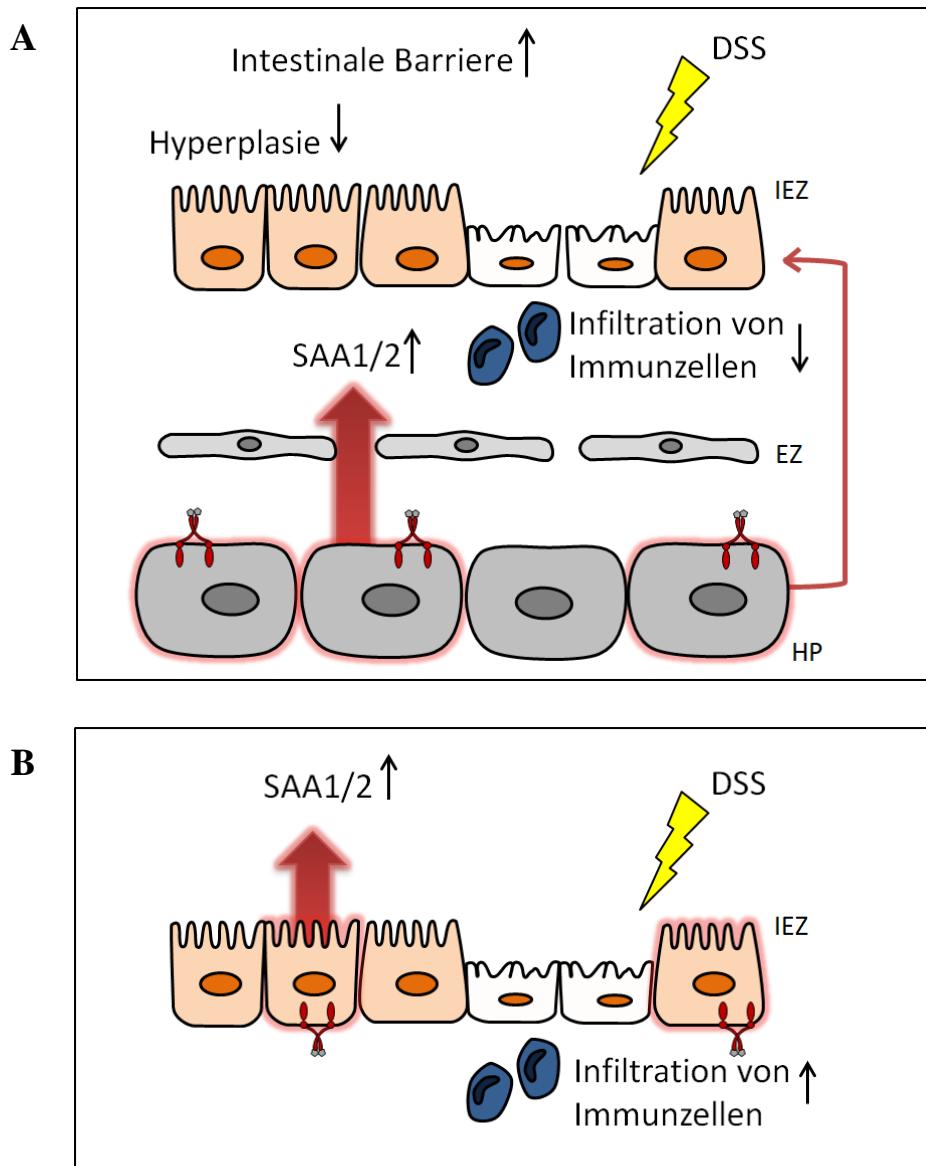


Abb. 5.3: Konstitutiv aktive gp130 Aktivierung wirkt schützend auf das Darmepithel bei einer DSS-Kolitis. (A) Lgp130 in Hepatozyten führt zur Verringerung von Hyperplasie und wirkt schützend auf die intestinale Barriereforschicht was zu einer geringeren Infiltration von Immunzellen führt. Die erhöhte SAA1/2 Expression wirkt schützend auf das Epithel bei einer DSS-Kolitis. (B) Lgp130 Aktivierung in intestinalen Epithelzellen hat eine erhöhte Expression von SAA1/2 zur Folge und wirkt schützend auf das Epithel bei einer DSS-Kolitis
HP = Hepatozyt, EZ = Endothelzelle, IEZ = intestinale Epithelzelle.

Keimfreie Mäuse, welche mit einer Untergruppe von Darmmikroben, segmentierten filamentösen Bakterien (SFB), besiedelt wurden, zeigten als Folge der Besiedlung eine Hochregulation von SAA1 und SAA2-Genexpressionen in intestinalen Epithelzellen, sowie eine Induktion von $T_{H}17$ -Zellen. Rekombinantes SAA1 verstärkte dabei deutlich die *in vitro*-Differenzierung naiver $CD4^{+}$ T-Zellen in $T_{H}17$ -Zellen [229]. Im Gegensatz zu den nicht-pathogenen $T_{H}17$ -Zellen, welche durch IL-6 und TGF β induziert werden, kann SAA ein

pathogenes pro-inflammatorisches T_{H17} Zell-Differenzierungsprogramm induzieren. Hierbei wirkt SAA zusammen mit IL-6, jedoch unabhängig von TGF β , direkt auf die T-Zellen [26]. Während der chronischen Darmentzündung findet eine massive Infiltration von T_{H17} -Zellen in den entzündeten Darm statt [338]. Unter pathologischen Bedingungen sezernieren T_{H17} -Zellen pro-inflammatorische Mediatoren wie IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22, die das Fortschreiten und die Prognose der chronischen Darmentzündung verschlimmern [339, 340]. So konnte bereits bei Patienten mit chronischen Darmentzündungen RNA-Transkripte von IL-17A und IL-17F in der entzündeten Darmschleimhaut nachgewiesen werden [341, 342]. Unter physiologischen Bedingungen regulieren mukosale T_{H17} -Zellen die Integrität der Darmschleimhautbarriere. Bei Barriereförderungen durch Verletzungen und Infektionen induziert IL-17 die Neutrophilenrekrutierung durch Sekretion von granulopoetischen Faktoren wie *granulocyte / macrophage-colony-stimulating factor* (GM-CSF) und verschiedenen Chemokinen durch Epithelzellen. Darüber hinaus regen sie Epithelzellen zur Produktion antimikrobieller Peptide an [343]. Die massive Infiltration von T_{H17} -Zellen während der Darmentzündung geht typischerweise mit einer Dysfunktion der epithelialen Barriere des Darms einher. Darüber hinaus induziert IL-17A die Rekrutierung von Neutrophilen und fördert die lokale Produktion anderer pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6 [344]. Trotz der pathogenen Rolle von T_{H17} -Zellen bei chronischen Darmentzündungen konnten verschiedene Studien ebenso eine gewebeschützende Wirkung von T_{H17} -Zellen bei experimenteller Kolitis nachweisen. Die Neutralisierung von IL-17A durch eine Antikörperbehandlung oder durch genetische Ablation führte in diesen Studien zu einer verstärkten Darmentzündung [345, 346]. Hierbei zeigte sich eine durch IL-17A erleichterte Bildung von Tight Junctions, indem es die Expression von Claudinen in Darmepithelzellen induziert. Gleichzeitig fand eine Stimulation der Muzinproduktion statt, wodurch die Barrierefunktion der Darmschleimhaut erhöht wurde [347]. Im Gegensatz zu den gewebeschützenden Eigenschaften von IL-17A wurde gezeigt, dass IL-17F-defiziente Mäuse milder DSS-induzierte Kolitissymptome entwickeln als Wildtyp-Mäuse [346]. Dies deutet insgesamt auf eine ambivalente Rolle von T_{H17} -Zellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hin. Weiterführende Untersuchungen in Form von Immunphänotypisierung von Lamina propria T-Zellen mittels Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting FACS*) würden hierbei weiteren Aufschluss geben. Gleichzeitig stellt dies eine sensitivere Methode zur Analyse der T_{H17} -Induktion dar und könnte spezifischere Ergebnisse zur T_{H17} -Induktion durch lokale und systemische SAA-Erhöhung liefern.

Im Vergleich zu Mäusen, welche keine DSS-Kolitis durchlaufen haben, waren die Veränderungen in der Zytokin Zusammensetzung in Colonlysaten von Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen nach einer DSS-Kolitis aufgehoben (Abb. 4.12A). Dies lässt vermuten, dass die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-23 während der akuten Entzündung in Immunzellen der Lamina propria induziert wird. Das Zytokin IL-23 ist in der entzündeten Darmschleimhaut von Patienten mit chronischen Darmentzündungen erhöht und stammt überwiegend von Makrophagen, dendritischen Zellen und gewebsinfiltrierenden Neutrophilen [348, 349]. Neben der Regulation von T_H17-Zellen trägt IL-23 zur mikrobiellen Abwehr von intrazellulären Bakterien bei. Hierbei wird die Sekretion von IL-23 durch Makrophagen der Lamina propria als Reaktion auf kommensale Bakterien, welche insbesondere bei Patienten mit chronischen Darmentzündungen im Vergleich zu Kontrollpatienten erhöht sind, hochreguliert [350, 351]. Hierbei konnte eine positive Korrelation zwischen IL-23 mRNA Spiegeln und makroskopischen Läsionen im Darm von Patienten mit chronischen Darmentzündungen aufgezeigt werden [352, 353]. Die pathogene Rolle von IL-23 konnte bereits im Mausversuch aufgezeigt werden. So waren Mäuse mit einer Deletion des IL-23R vor einer DSS-induzierten Kolitis geschützt. Dieser Befund ging mit verringerten Läsionen der Darmschleimhaut, einer verringerten Aktivierung angeborener lymphatischer Zellen, einer verminderten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und einer geringeren Infiltration von Granulozyten und Monozyten in die Lamina propria einher [354, 355].

5.4 Pro-tumorigene Rolle von konstitutiv aktivem gp130 in Hepatozyten und intestinalen Epithelzellen bei Kolitis-assoziiertem Darmkrebs

Chronische Entzündungen im Darm führen zu einer erhöhten Prädisposition für die Entwicklung von entzündungsassoziiertem Darmkrebs [39-41]. So konnten die Zytokine der IL-6 Familie als fehlendes Glied zwischen der Entzündung und Darmkrebs aufgezeigt werden [356]. Studien konnten IL-6 bereits eine Beteiligung am Tumorwachstum und -überleben bei Kolitis-assoziiertem Darmkrebs, sowie eine STAT3-abhängige pro-tumorigene Rolle nachweisen [357]. So konnte eine regulatorische Komponente zwischen entzündungsassoziiertem Zytokin in der Mikroumgebung und tumorerzeugender Expansion von Krebszellen aufgezeigt werden [221, 358].

Die konstitutiv aktive Lgp130-Expression in Hepatozyten von Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen führte zu einer erhöhten IL-6 Konzentration in Colonlysaten nach der AOM/DSS-Kolitis (Abb. 4.16A), zu einem erhöhten Gewichtsverlust, sowie zu einer schlechteren Regeneration (Abb. 4.13B). Dies stimmt mit Studien überein, wonach sich IL-6 bei verschiedenen Tumorentitäten wie auch bei Dickdarmkrebs als ein Prädikator für den Gewichtsverlust erwiesen hat [270]. Zudem beobachteten wir bei Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen eine erhöhte systemische Expressionen der Akut-Phase-Proteine SAA1 und SAA2 sowohl im Serum, als auch SAA1/2 Ablagerungen im Darm (Abb. 4.15A-C), während bei Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen eine lokale SAA1 und SAA2-Induktion im Darm stattfand (Abb. 4.23A). SAA1/2-Doppelknockout Mäuse zeigten in Studien eine signifikant geringere Tumorlast im Colon, sowie eine abgeschwächte Kolitis-Aktivität [359]. Dies stimmt mit unseren Beobachtungen überein, da sowohl eine systemische SAA1/2-Erhöhung bei Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse, als auch eine lokale SAA1/2-Erhöhung bei Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen eine gesteigerte Tumorinduktion bei einer AOM/DSS-Kolitis zur Folge hatte (Abb. 4.13C+E und Abb. 4.21C+E). Dies war jedoch nicht auf eine gesteigerte Tumorproliferation zurückzuführen (Abb. 4.14C). Die Tumorlast in beiden Mausmodellen korreliert mit einer SAA-Erhöhung. Dies lässt auf eine Assoziation von SAA mit der intestinalen Tumorentstehung, einem fortgeschrittenem Krankheitsverlauf und verschlechterten Überlebensrate in Patienten schließen [239]. Da die Tumorlast in beiden Mausmodellen jedoch vergleichbar war, scheint der Unterschied zwischen einer lokalen und systemischen SAA-Erhöhung nicht ausschlaggebend zu sein, bzw. die SAA Levels lokal im Darm ausschlaggebend für die Tumorentwicklung sind.

SAA wird als mögliches Bindeglied zwischen chronischen Entzündungen und Tumorentstehung angesehen, wobei erhöhte SAA-Spiegel zur Tumorinitiierung beitragen und die Tumorentwicklung beschleunigen kann [146]. Hierbei nimmt SAA gebunden an HDL bei der Tumopathogenese die Rolle als Adhäsionsprotein der extrazellulären Matrix (ECM) ein [360], indem es Bindestellen für die ECM-Komponenten Laminin [361] und Heparin [362] enthält. SAA kann somit über die Adhäsionsmotive mit der ECM interagieren und die Affinität verschiedener Zelltypen zur ECM beeinflussen [363, 364]. Die ECM ist ein hochgradig organisiertes Netzwerk aus Proteinen, Glykoproteinen, Hyaluronan und Proteoglykanen. Diese bilden ein molekulares Gerüst, das den Zellen mechanische Festigkeit, Elastizität und Bindungsstellen bietet. Gleichzeitig steuert die ECM die Diffusion und Migration von Zellen. Der Abbau und Veränderungen in der Zusammensetzung der ECM haben einen großen Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung von Tumoren [360]. Hierbei stellt der Abbau der ECM durch MMPs eine der Hauptursachen für eine Veränderung der ECM dar. MMPs gehören zur Familie von zinkabhängigen Endopeptidasen und können neben dem ECM-Abbau auch Wachstumsfaktoren, Zytokine und zelloberflächenassoziierte Adhäsions- und Signalrezeptoren beeinflussen [365]. Studien zeigten bereits einen Zusammenhang zwischen der Expression von SAA und MMPs, so kann SAA die Produktion von MMPs anregen und die Tumorinvasion über die ECM beeinflussen [360]. Dies lässt darauf schließen, dass das Vorhandensein von lokalen und systemischen SAA in unseren Mausmodellen die Tumorentstehung und -initiierung, jedoch nicht die Tumorproliferation fördert.

Neben der Tumorinitiation kann die Aktivierung des Akut-Phase-Proteins SAA die Immunüberwachung kanzerogener Zellen beeinträchtigen [366]. Die Immunaktivierung bei Krebs ist von dendritischen Zellen abhängig, welche Tumorantigene präsentieren, um tumorreaktive CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren [367, 368]. Da dendritische Zellen ein wichtiges Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem sind, ist die Regulierung der Differenzierung von großer Bedeutung [369, 370]. Hierbei zeigte sich, dass SAA die Differenzierung von dendritischen Zellen hemmt, indem es die GM-CSF Rezeptor-Expression, welche notwendig zur Differenzierung von dendritischen Zellen ist, durch die Aktivierung von TLR2 und FPR2 verringert [371]. Zusätzlich zeigten Studien, dass IL-6 die Bildung von dendritischen Zellen stört und die Differenzierung unreifer myeloider Zellen weg von dendritischen Zellen und hin zu Makrophagen lenkt [12]. SAA kann somit die Produktivität der Krebs-Immunüberwachung beeinträchtigen und die anti-Tumorimmunität hemmen, indem es die Differenzierung von dendritischen Zellen hemmt. Zukünftige Studien

könnten mittels FACS- und mRNA-Level Analysen von GM-CSFR [371] die Hypothese bestätigen, ob das vermehrte SAA in unseren Mausmodellen tatsächlich zu einer reduzierten und gehemmten Differenzierung von dendritischen Zellen führt.

Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäuse zeigten eine gesteigerte IL-23 Zytokinkonzentration in Colonlysaten (Abb. 4.16). IL-23 konnte bereits mit einem breiten Spektrum von Krebsarten, einschließlich Kolitis-assoziiertem Darmkrebs in Verbindung gebracht werden [372]. Studien zeigten, dass die IL-23-Signalgebung bei Entzündungen eine fördernde Wirkung auf die Tumorentstehung und das Tumorwachstum hat. Darüber hinaus übt IL-23 durch Unterdrückung der Tumorinfiltration von CD8⁺ T-Zellen eine unterstützende Wirkung auf die Tumorentwicklung aus [314, 373]. IL-23 wird hauptsächlich von tumorassoziierten myeloiden Zellen wie aktivierten Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen produziert. Diese werden durch mikrobielle Produkte und *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) aktiviert, welche in den Tumor, jedoch nicht in das umliegende Gewebe eindringen [314, 317, 374]. Dies lässt auf eine tumorfördernde Rolle des IL-23 bei Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen schließen (Abb. 5.4). Weiterführende Studien könnten darüber Aufschluss geben, welches die hauptsächlichen IL-23 produzierenden Zellen in unseren Mausmodellen darstellen.

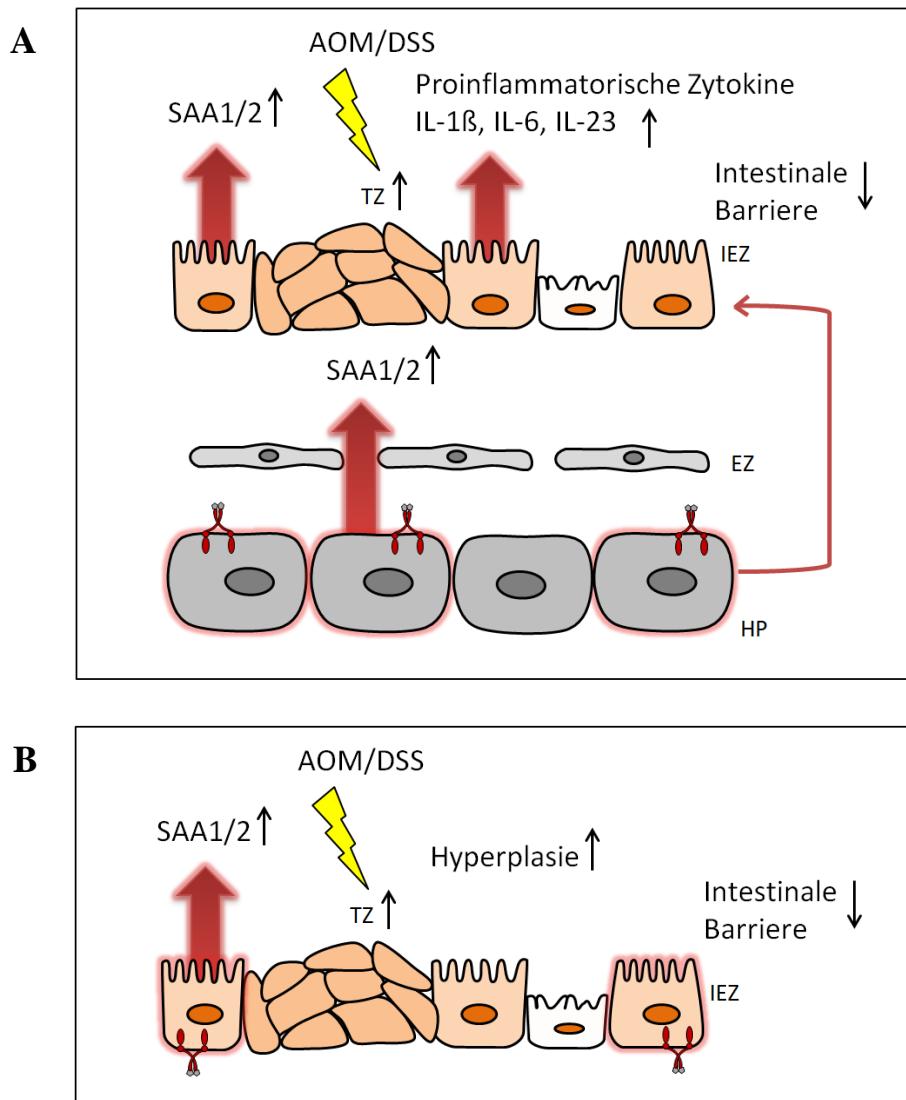


Abb. 5.4: Konstitutiv aktive gp130 Aktivierung führt zur vermehrten Tumorinduktion. (A) Lgp130 in Hepatozyten führt zur vermehrten Produktion von SAA1/2 und proinflammatorischen Zytokine von intestinalen Epithelzellen. Die intestinale Barriere wird gestört und es findet eine erhöhte Infiltration von Immunzellen statt. Lgp130 in Hepatozyten führt zu einer vermehrten Tumorentwicklung. (B) Lgp130 in intestinalen Epithelzellen führt zur Hyperplasie von intestinalen Epithelzellen und SAA1/2 Produktion durch intestinale Epithelzellen. Die intestinale Barriere wird gestärkt, was zu einer verringerten Infiltration von Immunzellen führt. Aktivierung von Lgp130 in intestinalen Epithelzellen hat eine vermehrte Tumorentwicklung zur Folge. HP = Hepatozyt, EZ = Endothelzelle, IEZ = intestinale Epithelzelle, TZ = Tumorzellen.

Unsere Studien konnten zum ersten Mal zeigen, dass eine alleinige gp130-Aktivierung in Hepatozyten zur Induktion der Akut-Phase-Proteine und der angeborenen Immunantwort ausreicht. Wir konnten zeigen, dass eine zellautonome gp130 Aktivierung in Hepatozyten zur Aktivierung von Akut-Phase-Proteinen, Mobilisierung und Rekrutierung von myeloiden Zellen und einer robusten Aktivierung der angeborenen Immunantwort führt. Wir konnten nachweisen, dass eine alleinige Erhöhung des Akut-Phase-Proteins SAA ausreichend für die Induktion einer AA-Amyloidose ist. Wir konnten zeigen, dass eine zellautonome gp130 Aktivierung in intestinalen Epithelzellen zu einer lokalen Erhöhung von SAA-Proteinen im Darm führt. Sowohl eine systemische SAA Erhöhung bei Alb-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen, als auch eine lokale SAA Erhöhung bei Vil-CreERT²::ROSA^{Lgp130/Lgp130} Mäusen hatten nur geringe Auswirkungen auf eine akute DSS-Kolitis. Wohingegen die lokale bzw. systemische SAA-Erhöhung eine pro-tumorigene Rolle bei der Tumorinitiierung beim Kolitis-assoziiertem Darmkrebs hatte. Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass SAA bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen als therapeutisches Ziel dienen könnte, um die chronischen Entzündungen und das damit verbundene Risiko der Entwicklung von Kolitis-assoziiertem Darmkrebs zu verringern.

6 Literaturverzeichnis

1. **Heinrich, P.C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L.** Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J.* 334(Pt 2), 297-314 (1998).
2. **Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S.** The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* 1813(5), 878-888 (2011).
3. **Rose-John, S.** Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 10(2), (2018).
4. **Kang, S., Narazaki, M., Metwally, H. & Kishimoto, T.** Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. *J Exp Med.* 217(5), (2020).
5. **Kishimoto, T.** IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol.* 22(5), 347-352 (2010).
6. **Haegeman, G., Content, J., Volckaert, G., Deryck, R., Tavernier, J. & Fiers, W.** Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts. *Eur J Biochem.* 159(3), 625-632 (1986).
7. **Bazan, J.F.** Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today.* 11(10), 350-354 (1990).
8. **Yoshizaki, K., Nakagawa, T., Kaieda, T., Muraguchi, A., Yamamura, Y. & Kishimoto, T.** Induction of proliferation and Ig production in human B leukemic cells by anti-immunoglobulins and T cell factors. *J Immunol.* 128(3), 1296-1301 (1982).
9. **Takatsuki, F., Okano, A., Suzuki, C., Chieda, R., Takahara, Y., Hirano, T., Kishimoto, T., Hamuro, J. & Akiyama, Y.** Human recombinant IL-6/B cell stimulatory factor 2 augments murine antigen-specific antibody responses in vitro and in vivo. *J Immunol.* 141(9), 3072-3077 (1988).
10. **Hirano, T., Taga, T., Yamasaki, K., Matsuda, T., Yasukawa, K., Hirata, Y., Yawata, H., Tanabe, O., Akira, S. & Kishimoto, T.** Molecular cloning of the cDNAs for interleukin-6/B cell stimulatory factor 2 and its receptor. *Ann NY Acad Sci.* 557, 167-180 (1989).
11. **Leary, A.G., Ikebuchi, K., Hirai, Y., Wong, G.G., Yang, Y.C., Clark, S.C. & Ogawa, M.** Synergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells: comparison with interleukin-1 alpha. *Blood.* 71(6), 1759-1763 (1988).
12. **Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J. & Palucka, A.K.** IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol.* 1(6), 510-514 (2000).

13. **Hill, R.J., Warren, M.K., Stenberg, P., Levin, J., Corash, L., Drummond, R., Baker, G., Levin, F. & Mok, Y.** Stimulation of megakaryocytopoiesis in mice by human recombinant interleukin-6. *Blood*. 77(1), 42-48 (1991).
14. **Liu, F., Poursine-Laurent, J., Wu, H.Y. & Link, D.C.** Interleukin-6 and the granulocyte colony-stimulating factor receptor are major independent regulators of granulopoiesis in vivo but are not required for lineage commitment or terminal differentiation. *Blood*. 90(7), 2583-2590 (1997).
15. **Wallenius, V., Wallenius, K., Ahrén, B., Rudling, M., Carlsten, H., Dickson, S.L., Ohlsson, C. & Jansson, J.O.** Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med*. 8(1), 75-79 (2002).
16. **Kraakman, M.J., Kammoun, H.L., Allen, T.L., Deswaerte, V., Henstridge, D.C., Estevez, E., Matthews, V.B., Neill, B., White, D.A., Murphy, A.J., Peijs, L., Yang, C., Risis, S., Bruce, C.R., Du, X.J., Bobik, A., Lee-Young, R.S., Kingwell, B.A., Vasanthakumar, A., Shi, W., Kallies, A., Lancaster, G.I., Rose-John, S. & Febbraio, M.A.** Blocking IL-6 trans-signaling prevents high-fat diet-induced adipose tissue macrophage recruitment but does not improve insulin resistance. *Cell Metab*. 21(3), 403-416 (2015).
17. **Van Hall, G., Steensberg, A., Sacchetti, M., Fischer, C., Keller, C., Schjerling, P., Hiscock, N., Møller, K., Saltin, B., Febbraio, M.A. & Pedersen, B.K.** Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 88(7), 3005-3010 (2003).
18. **Carey, A.L., Steinberg, G.R., Macaulay, S.L., Thomas, W.G., Holmes, A.G., Ramm, G., Prelovsek, O., Hohnen-Behrens, C., Watt, M.J., James, D.E., Kemp, B.E., Pedersen, B.K. & Febbraio, M.A.** Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes*. 55(10), 2688-2697 (2006).
19. **Nish, S.A., Schenten, D., Wunderlich, F.T., Pope, S.D., Gao, Y., Hoshi, N., Yu, S., Yan, X., Lee, H.K., Pasman, L., Brodsky, I., Yordy, B., Zhao, H., Brüning, J. & Medzhitov, R.** T cell-intrinsic role of IL-6 signaling in primary and memory responses. *Elife*. 3, e01949 (2014).
20. **Mosmann, T.R. & Sad, S.** The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. 17(3), 138-146 (1996).
21. **Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L. & Kuchroo, V.K.** Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 441(7090), 235-238 (2006).
22. **Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J. & Littman, D.R.** The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 $+$ T helper cells. *Cell*. 126(6), 1121-1133 (2006).

23. **Zhou, L., Ivanov, I.I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J. & Littman, D.R.** IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol.* 8(9), 967-974 (2007).
24. **Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., Grainger, J.R., Chen, Q., Kanno, Y., Watford, W.T., Sun, H.W., Eberl, G., Shevach, E.M., Belkaid, Y., Cua, D.J., Chen, W. & O'Shea, J.J.** Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature.* 467(7318), 967-971 (2010).
25. **Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleinewietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D.A., Sobel, R.A., Regev, A. & Kuchroo, V.K.** Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol.* 13(10), 991-999 (2012).
26. **Lee, J.Y., Hall, J.A., Kroehling, L., Wu, L., Najar, T., Nguyen, H.H., Lin, W.Y., Yeung, S.T., Silva, H.M., Li, D., Hine, A., Loke, P., Hudesman, D., Martin, J.C., Kenigsberg, E., Merad, M., Khanna, K.M. & Littman, D.R.** Serum Amyloid A Proteins Induce Pathogenic Th17 Cells and Promote Inflammatory Disease. *Cell.* 180(1), 79-91.e16 (2020).
27. **Nowell, M.A., Williams, A.S., Carty, S.A., Scheller, J., Hayes, A.J., Jones, G.W., Richards, P.J., Slinn, S., Ernst, M., Jenkins, B.J., Topley, N., Rose-John, S. & Jones, S.A.** Therapeutic targeting of IL-6 trans signaling counteracts STAT3 control of experimental inflammatory arthritis. *J Immunol.* 182(1), 613-622 (2009).
28. **Rose-John, S.** IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci.* 8(9), 1237-1247 (2012).
29. **Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P. & Baumann, H.** Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84(20), 7251-7255 (1987).
30. **Heinrich, P.C., Castell, J.V. & Andus, T.** Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 265(3), 621-636 (1990).
31. **Stahl, E.A., Raychaudhuri, S., Remmers, E.F., Xie, G., Eyre, S., Thomson, B.P., Li, Y., Kurreeman, F.A., Zhernakova, A., Hinks, A., Guiducci, C., Chen, R., Alfredsson, L., Amos, C.I., Ardlie, K.G., Barton, A., Bowes, J., Brouwer, E., Burtt, N.P., Catanese, J.J., Coblyn, J., Coenen, M.J., Costenbader, K.H., Criswell, L.A., Crusius, J.B., Cui, J., de Bakker, P.I., De Jager, P.L., Ding, B., Emery, P., Flynn, E., Harrison, P., Hocking, L.J., Huizinga, T.W., Kastner, D.L., Ke, X., Lee, A.T., Liu, X., Martin, P., Morgan, A.W., Padyukov, L., Posthumus, M.D., Radstake, T.R., Reid, D.M., Seielstad, M., Seldin, M.F., Shadick, N.A., Steer, S., Tak, P.P., Thomson, W., van der Helm-van Mil, A.H., van der Horst-Bruinsma, I.E., van der Schoot, C.E., van Riel, P.L., Weinblatt, M.E., Wilson, A.G., Wolbink, G.J., Wordsworth, B.P., Wijmenga, C., Karlson, E.W., Toes, R.E., de Vries, N., Begovich, A.B., Worthington, J., Siminovitch, K.A., Gregersen, P.K., Klareskog, L. & Plenge, R.M.** Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet.* 42(6), 508-514 (2010).

32. **Fishman, D., Faulds, G., Jeffery, R., Mohamed-Ali, V., Yudkin, J.S., Humphries, S. & Woo, P.** The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 102(7), 1369-1376 (1998).
33. **Yoshizaki, K., Matsuda, T., Nishimoto, N., Kuritani, T., Taeho, L., Aozasa, K., Nakahata, T., Kawai, H., Tagoh, H., Komori, T., Kishimoto, S., Hirano, T. & Kishimoto, T.** Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease. *Blood.* 74(4), 1360-1367 (1989).
34. **Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Müllberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schütz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., Strand, D., Czaja, J., Schlaak, J.F., Lehr, H.A., Autschbach, F., Schürmann, G., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Ito, H., Kishimoto, T., Galle, P.R., Rose-John, S. & Neurath, M.F.** Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med.* 6(5), 583-588 (2000).
35. **Trikha, M., Corringham, R., Klein, B. & Rossi, J.F.** Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clin Cancer Res.* 9(13), 4653-4665 (2003).
36. **Giannitrapani, L., Cervello, M., Soresi, M., Notarbartolo, M., La Rosa, M., Virruso, L., D'Alessandro, N. & Montalto, G.** Circulating IL-6 and sIL-6R in patients with hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci.* 963, 46-52 (2002).
37. **Bergmann, J., Müller, M., Baumann, N., Reichert, M., Heneweer, C., Bolik, J., Lücke, K., Gruber, S., Carambia, A., Boretius, S., Leuschner, I., Becker, T., Rabe, B., Herkel, J., Wunderlich, F.T., Mittrücker, H.W., Rose-John, S. & Schmidt-Arras, D.** IL-6 trans-signaling is essential for the development of hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology.* 65(1), 89-103 (2017).
38. **Miura, T., Mitsunaga, S., Ikeda, M., Shimizu, S., Ohno, I., Takahashi, H., Furuse, J., Inagaki, M., Higashi, S., Kato, H., Terao, K. & Ochiai, A.** Characterization of patients with advanced pancreatic cancer and high serum interleukin-6 levels. *Pancreas.* 44(5), 756-763 (2015).
39. **Ullman, T.A. & Itzkowitz, S.H.** Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology.* 140(6), 1807-1816 (2011).
40. **Jess, T., Rungoe, C. & Peyrin-Biroulet, L.** Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 10(6), 639-645 (2012).
41. **Jess, T., Frisch, M. & Simonsen, J.** Trends in overall and cause-specific mortality among patients with inflammatory bowel disease from 1982 to 2010. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 11(1), 43-48 (2013).

42. **Fattori, E., Cappelletti, M., Costa, P., Sellitto, C., Cantoni, L., Carelli, M., Faggioni, R., Fantuzzi, G., Ghezzi, P. & Poli, V.** Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *J Exp Med.* 180(4), 1243-1250 (1994).
43. **Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H. & Köhler, G.** Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature.* 368(6469), 339-342 (1994).
44. **Cressman, D.E., Greenbaum, L.E., DeAngelis, R.A., Ciliberto, G., Furth, E.E., Poli, V. & Taub, R.** Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science.* 274(5291), 1379-1383 (1996).
45. **Michalopoulos, G.K.** Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol.* 176(1), 2-13 (2010).
46. **Sun, Y., Tokushige, K., Isono, E., Yamauchi, K. & Obata, H.** Elevated serum interleukin-6 levels in patients with acute hepatitis. *J Clin Immunol.* 12(3), 197-200 (1992).
47. **Deviere, J., Content, J., Denys, C., Vandenbussche, P., Schandene, L., Wybran, J. & Dupont, E.** High interleukin-6 serum levels and increased production by leucocytes in alcoholic liver cirrhosis. Correlation with IgA serum levels and lymphokines production. *Clin Exp Immunol.* 77(2), 221-225 (1989).
48. **Kakumu, S., Shinagawa, T., Ishikawa, T., Yoshioka, K., Wakita, T. & Ida, N.** Interleukin 6 production by peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis B virus infection and primary biliary cirrhosis. *Gastroenterol Jpn.* 28(1), 18-24 (1993).
49. **Soresi, M., Giannitrapani, L., D'Antona, F., Florena, A.M., La Spada, E., Terranova, A., Cervello, M., D'Alessandro, N. & Montalto, G.** Interleukin-6 and its soluble receptor in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 12(16), 2563-2568 (2006).
50. **Rebouissou, S., Amessou, M., Couchy, G., Poussin, K., Imbeaud, S., Pilati, C., Izard, T., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P. & Zucman-Rossi, J.** Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature.* 457(7226), 200-204 (2009).
51. **Aleksandrova, K., Boeing, H., Nöthlings, U., Jenab, M., Fedirko, V., Kaaks, R., Lukanova, A., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Boffetta, P., Trepo, E., Westphal, S., Duarte-Salles, T., Stepien, M., Overvad, K., Tjønneland, A., Halkjaer, J., Boutron-Ruault, M.C., Dossus, L., Racine, A., Lagiou, P., Bamia, C., Benetou, V., Agnoli, C., Palli, D., Panico, S., Tumino, R., Vineis, P., Bueno-de-Mesquita, B., Peeters, P.H., Gram, I.T., Lund, E., Weiderpass, E., Quirós, J.R., Agudo, A., Sánchez, M.J., Gavrila, D., Barricarte, A., Dorronsoro, M., Ohlsson, B., Lindkvist, B., Johansson, A., Sund, M., Khaw, K.T., Wareham, N., Travis, R.C., Riboli, E. & Pischon, T.** Inflammatory and metabolic biomarkers and risk of liver and biliary tract cancer. *Hepatology.* 60(3), 858-871 (2014).
52. **Maione, D., Di Carlo, E., Li, W., Musiani, P., Modesti, A., Peters, M., Rose-John, S., Della Rocca, C., Tripodi, M., Lazzaro, D., Taub, R., Savino, R. & Ciliberto, G.**

- Coexpression of IL-6 and soluble IL-6R causes nodular regenerative hyperplasia and adenomas of the liver. *Embo j.* 17(19), 5588-5597 (1998).
53. **Mudter, J. & Neurath, M.F.** IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis.* 13(8), 1016-1023 (2007).
54. **Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L. & Karin, M.** IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell.* 15(2), 103-113 (2009).
55. **Gross, V., Andus, T., Caesar, I., Roth, M. & Schölmerich, J.** Evidence for continuous stimulation of Interleukin-6 production in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 102(2), 514-519 (1992).
56. **Nikolaus, S., Waetzig, G.H., Butzin, S., Ziolkiewicz, M., Al-Massad, N., Thieme, F., Lövgren, U., Rasmussen, B.B., Reinheimer, T.M., Seegert, D., Rosenstiel, P., Szymczak, S. & Schreiber, S.** Evaluation of interleukin-6 and its soluble receptor components sIL-6R and sgp130 as markers of inflammation in inflammatory bowel diseases. *Int J Colorectal Dis.* 33(7), 927-936 (2018).
57. **Hyams, J.S., Fitzgerald, J.E., Treem, W.R., Wyzga, N. & Kreutzer, D.L.** Relationship of functional and antigenic interleukin 6 to disease activity in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 104(5), 1285-1292 (1993).
58. **Neurath, M.F., Finotto, S., Fuss, I., Boirivant, M., Galle, P.R. & Strober, W.** Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol.* 22(1), 21-26 (2001).
59. **Pickert, G., Neufert, C., Leppkes, M., Zheng, Y., Wittkopf, N., Warntjen, M., Lehr, H.A., Hirth, S., Weigmann, B., Wirtz, S., Ouyang, W., Neurath, M.F. & Becker, C.** STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med.* 206(7), 1465-1472 (2009).
60. **Atreya, R., Billmeier, U., Rath, T., Mudter, J., Vieth, M., Neumann, H. & Neurath, M.F.** First case report of exacerbated ulcerative colitis after anti-interleukin-6R salvage therapy. *World J Gastroenterol.* 21(45), 12963-12969 (2015).
61. **Naito, Y., Takagi, T., Uchiyama, K., Kuroda, M., Kokura, S., Ichikawa, H., Yanagisawa, R., Inoue, K., Takano, H., Satoh, M., Yoshida, N., Okanoue, T. & Yoshikawa, T.** Reduced intestinal inflammation induced by dextran sodium sulfate in interleukin-6-deficient mice. *Int J Mol Med.* 14(2), 191-196 (2004).
62. **Lee, M.J., Lee, J.K., Choi, J.W., Lee, C.S., Sim, J.H., Cho, C.H., Lee, K.H., Cho, I.H., Chung, M.H., Kim, H.R. & Ye, S.K.** Interleukin-6 induces S100A9 expression in colonic epithelial cells through STAT3 activation in experimental ulcerative colitis. *PLoS One.* 7(9), e38801 (2012).

63. **Jostock, T., Müllberg, J., Ozbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M.F. & Rose-John, S.** Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem.* 268(1), 160-167 (2001).
64. **Mitsuyama, K., Matsumoto, S., Masuda, J., Yamasakii, H., Kuwaki, K., Takedatsu, H. & Sata, M.** Therapeutic strategies for targeting the IL-6/STAT3 cytokine signaling pathway in inflammatory bowel disease. *Anticancer Res.* 27(6a), 3749-3756 (2007).
65. **Schreiber, S., Aden, K., Bernardes, J.P., Conrad, C., Tran, F., Höper, H., Volk, V., Mishra, N., Blase, J.I., Nikolaus, S., Bethge, J., Kühbacher, T., Röcken, C., Chen, M., Cottingham, I., Petri, N., Rasmussen, B.B., Lokau, J., Lenk, L., Garbers, C., Feuerhake, F., Rose-John, S., Waetzig, G.H. & Rosenstiel, P.** Therapeutic Interleukin-6 Trans-signaling Inhibition by Olamkicept (sgp130Fc) in Patients With Active Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* 160(7), 2354-2366.e2311 (2021).
66. **Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T. & Kishimoto, T.** Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell.* 63(6), 1149-1157 (1990).
67. **Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S.** Endosomes as Signaling Platforms for IL-6 Family Cytokine Receptors. *Front Cell Dev Biol.* 9, 688314 (2021).
68. **Narazaki, M., Witthuhn, B.A., Yoshida, K., Silvennoinen, O., Yasukawa, K., Ihle, J.N., Kishimoto, T. & Taga, T.** Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(6), 2285-2289 (1994).
69. **Haan, C., Heinrich, P.C. & Behrmann, I.** Structural requirements of the interleukin-6 signal transducer gp130 for its interaction with Janus kinase 1: the receptor is crucial for kinase activation. *Biochem J.* 361(Pt 1), 105-111 (2002).
70. **Kishimoto, T.** Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol.* 23, 1-21 (2005).
71. **Bravo, J., Staunton, D., Heath, J.K. & Jones, E.Y.** Crystal structure of a cytokine-binding region of gp130. *Embo j.* 17(6), 1665-1674 (1998).
72. **Kurth, I., Horsten, U., Pflanz, S., Timmermann, A., Küster, A., Dahmen, H., Tacken, I., Heinrich, P.C. & Müller-Newen, G.** Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130. *J Immunol.* 164(1), 273-282 (2000).
73. **Paonessa, G., Graziani, R., De Serio, A., Savino, R., Ciapponi, L., Lahm, A., Salvati, A.L., Toniatti, C. & Ciliberto, G.** Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling. *Embo j.* 14(9), 1942-1951 (1995).
74. **Boulanger, M.J., Chow, D.C., Brevnova, E.E. & Garcia, K.C.** Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science.* 300(5628), 2101-2104 (2003).

75. **Marengere, L.E. & Pawson, T.** Structure and function of SH2 domains. *J Cell Sci Suppl.* 18, 97-104 (1994).
76. **Lim, C.P. & Cao, X.** Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol Biosyst.* 2(11), 536-550 (2006).
77. **Zhong, Z., Wen, Z. & Darnell, J.E., Jr.** Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science.* 264(5155), 95-98 (1994).
78. **Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P.C. & Graeve, L.** 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. *J Biol Chem.* 271(22), 12991-12998 (1996).
79. **Suthaus, J., Tillmann, A., Lorenzen, I., Bulanova, E., Rose-John, S. & Scheller, J.** Forced homo- and heterodimerization of all gp130-type receptor complexes leads to constitutive ligand-independent signaling and cytokine-independent growth. *Mol Biol Cell.* 21(15), 2797-2807 (2010).
80. **Kumar, G., Gupta, S., Wang, S. & Nel, A.E.** Involvement of Janus kinases, p52shc, Raf-1, and MEK-1 in the IL-6-induced mitogen-activated protein kinase cascade of a growth-responsive B cell line. *J Immunol.* 153(10), 4436-4447 (1994).
81. **Lee, I.S., Liu, Y., Narazaki, M., Hibi, M., Kishimoto, T. & Taga, T.** Vav is associated with signal transducing molecules gp130, Grb2 and Erk2, and is tyrosine phosphorylated in response to interleukin-6. *FEBS Lett.* 401(2-3), 133-137 (1997).
82. **Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Müller-Newen, G. & Schaper, F.** Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 374(Pt 1), 1-20 (2003).
83. **Nussinov, R., Tsai, C.J. & Jang, H.** Does Ras Activate Raf and PI3K Allosterically? *Front Oncol.* 9, 1231 (2019).
84. **Pugazhenthi, S., Nesterova, A., Sable, C., Heidenreich, K.A., Boxer, L.M., Heasley, L.E. & Reusch, J.E.** Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem.* 275(15), 10761-10766 (2000).
85. **Corvinus, F.M., Orth, C., Moriggl, R., Tsareva, S.A., Wagner, S., Pfitzner, E.B., Baus, D., Kaufmann, R., Huber, L.A., Zatloukal, K., Beug, H., Ohlschläger, P., Schütz, A., Halbhuber, K.J. & Friedrich, K.** Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. *Neoplasia.* 7(6), 545-555 (2005).
86. **Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C. & González-Barón, M.** PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.* 30(2), 193-204 (2004).

87. **Porta, C., Paglino, C. & Mosca, A.** Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol.* 4, 64 (2014).
88. **Kershaw, N.J., Murphy, J.M., Liau, N.P., Varghese, L.N., Lakyushin, A., Whitlock, E.L., Lucet, I.S., Nicola, N.A. & Babon, J.J.** SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol.* 20(4), 469-476 (2013).
89. **Nicholson, S.E., De Souza, D., Fabri, L.J., Corbin, J., Willson, T.A., Zhang, J.G., Silva, A., Asimakis, M., Farley, A., Nash, A.D., Metcalf, D., Hilton, D.J., Nicola, N.A. & Baca, M.** Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(12), 6493-6498 (2000).
90. **Croker, B.A., Krebs, D.L., Zhang, J.G., Wormald, S., Willson, T.A., Stanley, E.G., Robb, L., Greenhalgh, C.J., Förster, I., Clausen, B.E., Nicola, N.A., Metcalf, D., Hilton, D.J., Roberts, A.W. & Alexander, W.S.** SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol.* 4(6), 540-545 (2003).
91. **Babon, J.J., Varghese, L.N. & Nicola, N.A.** Inhibition of IL-6 family cytokines by SOCS3. *Semin Immunol.* 26(1), 13-19 (2014).
92. **Schaper, F. & Rose-John, S.** Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26(5), 475-487 (2015).
93. **Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Günther, M., Graeve, L., Buse, G., Mackiewicz, A., Heinrich, P.C. & Rose-John, S.** The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol.* 23(2), 473-480 (1993).
94. **Rose-John, S. & Heinrich, P.C.** Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J.* 300(Pt 2), 281-290 (1994).
95. **O'Shea, E.K., Rutkowski, R., Stafford, W.F., 3rd & Kim, P.S.** Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun. *Science.* 245(4918), 646-648 (1989).
96. **Patel, N., Herrman, J.M., Timans, J.C. & Kastelein, R.A.** Functional replacement of cytokine receptor extracellular domains by leucine zippers. *J Biol Chem.* 271(48), 30386-30391 (1996).
97. **Behncken, S.N., Billestrup, N., Brown, R., Amstrup, J., Conway-Campbell, B. & Waters, M.J.** Growth hormone (GH)-independent dimerization of GH receptor by a leucine zipper results in constitutive activation. *J Biol Chem.* 275(22), 17000-17007 (2000).
98. **Stuhlmann-Laeisz, C., Lang, S., Chalaris, A., Krzysztof, P., Enge, S., Eichler, J., Klingmüller, U., Samuel, M., Ernst, M., Rose-John, S. & Scheller, J.** Forced dimerization of gp130 leads to constitutive STAT3 activation, cytokine-independent growth, and blockade of differentiation of embryonic stem cells. *Mol Biol Cell.* 17(7), 2986-2995 (2006).

99. **Ahier, A. & Jarriault, S.** Simultaneous expression of multiple proteins under a single promoter in *Caenorhabditis elegans* via a versatile 2A-based toolkit. *Genetics*. 196(3), 605-613 (2014).
100. **Daniels, R.W., Rossano, A.J., Macleod, G.T. & Ganetzky, B.** Expression of multiple transgenes from a single construct using viral 2A peptides in *Drosophila*. *PLoS One*. 9(6), e100637 (2014).
101. **Friedrich, G. & Soriano, P.** Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev*. 5(9), 1513-1523 (1991).
102. **Kristianto, J., Johnson, M.G., Zastrow, R.K., Radcliff, A.B. & Blank, R.D.** Spontaneous recombinase activity of Cre-ERT2 in vivo. *Transgenic Res*. 26(3), 411-417 (2017).
103. **Feil, R., Wagner, J., Metzger, D. & Chambon, P.** Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun*. 237(3), 752-757 (1997).
104. **Madison, B.B., Dunbar, L., Qiao, X.T., Braunstein, K., Braunstein, E. & Gumucio, D.L.** Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J Biol Chem*. 277(36), 33275-33283 (2002).
105. **el Marjou, F., Janssen, K.P., Chang, B.H., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D. & Robine, S.** Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis*. 39(3), 186-193 (2004).
106. **Tanimizu, N. & Mitaka, T.** Re-evaluation of liver stem/progenitor cells. *Organogenesis*. 10(2), 208-215 (2014).
107. **Zorn, A.M.** Liver development. in *StemBook* (Harvard Stem Cell Institute
- Copyright: © 2008 Aaron M. Zorn., Cambridge (MA), 2008).
108. **Blouin, A., Bolender, R.P. & Weibel, E.R.** Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol*. 72(2), 441-455 (1977).
109. **Maroni, L., Haibo, B., Ray, D., Zhou, T., Wan, Y., Meng, F., Marzoni, M. & Alpini, G.** Functional and structural features of cholangiocytes in health and disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 1(4), 368-380 (2015).
110. **Blaner, W.S., O'Byrne, S.M., Wongsiriroj, N., Kluwe, J., D'Ambrosio, D.M., Jiang, H., Schwabe, R.F., Hillman, E.M., Piantedosi, R. & Libien, J.** Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta*. 1791(6), 467-473 (2009).

111. **Tsuchida, T. & Friedman, S.L.** Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 14(7), 397-411 (2017).
112. **Elchaninov, A.V., Fatkhudinov, T.K., Vishnyakova, P.A., Lokhonina, A.V. & Sukhikh, G.T.** Phenotypical and Functional Polymorphism of Liver Resident Macrophages. *Cells.* 8(9), (2019).
113. **Dou, L., Shi, X., He, X. & Gao, Y.** Macrophage Phenotype and Function in Liver Disorder. *Front Immunol.* 10, 3112 (2019).
114. **Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E., Pollard, J.W., Frampton, J., Liu, K.J. & Geissmann, F.** A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science.* 336(6077), 86-90 (2012).
115. **Knolle, P.A. & Gerken, G.** Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev.* 174, 21-34 (2000).
116. **Bilzer, M., Roggel, F. & Gerbes, A.L.** Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* 26(10), 1175-1186 (2006).
117. **Dixon, L.J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M.T. & Nagy, L.E.** Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol.* 3(2), 785-797 (2013).
118. **Frevert, U., Engelmann, S., Zougbédé, S., Stange, J., Ng, B., Matuschewski, K., Liebes, L. & Yee, H.** Intravital observation of Plasmodium berghei sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol.* 3(6), e192 (2005).
119. **Mowat, A.M.** Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol.* 3(4), 331-341 (2003).
120. **Baumann, H. & Gauldie, J.** The acute phase response. *Immunol Today.* 15(2), 74-80 (1994).
121. **Gabay, C. & Kushner, I.** Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 340(6), 448-454 (1999).
122. **Zhang, D., Sun, M., Samols, D. & Kushner, I.** STAT3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6. *J Biol Chem.* 271(16), 9503-9509 (1996).
123. **Gruys, E., Toussaint, M.J., Niewold, T.A. & Koopmans, S.J.** Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B.* 6(11), 1045-1056 (2005).
124. **Schrödl, W., Büchler, R., Wendler, S., Reinhold, P., Muckova, P., Reindl, J. & Rhode, H.** Acute phase proteins as promising biomarkers: Perspectives and limitations for human and veterinary medicine. *Proteomics Clin Appl.* 10(11), 1077-1092 (2016).

125. **Serrano, I., Luque, A. & Aran, J.M.** Exploring the Immunomodulatory Moonlighting Activities of Acute Phase Proteins for Tolerogenic Dendritic Cell Generation. *Front Immunol.* 9, 892 (2018).
126. **Quinton, L.J., Blahna, M.T., Jones, M.R., Allen, E., Ferrari, J.D., Hilliard, K.L., Zhang, X., Sabharwal, V., Algül, H., Akira, S., Schmid, R.M., Pelton, S.I., Spira, A. & Mizgerd, J.P.** Hepatocyte-specific mutation of both NF-κB RelA and STAT3 abrogates the acute phase response in mice. *J Clin Invest.* 122(5), 1758-1763 (2012).
127. **Oeckinghaus, A. & Ghosh, S.** The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1(4), a000034 (2009).
128. **Zheng, H., Fletcher, D., Kozak, W., Jiang, M., Hofmann, K.J., Conn, C.A., Soszynski, D., Grabiec, C., Trumbauer, M.E., Shaw, A., Kostura, M.J., Stevens, K., Rosen, H., North, R.J., Chen, H.Y., Tocci, M.J., Kluger, J.M. & Van der Ploeg, L.H.T.** Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 beta-deficient mice. *Immunity.* 3(1), 9-19 (1995).
129. **Bode, J.G., Albrecht, U., Häussinger, D., Heinrich, P.C. & Schaper, F.** Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-κB-dependent signaling. *Eur J Cell Biol.* 91(6-7), 496-505 (2012).
130. **Alonzi, T., Maritano, D., Gorgoni, B., Rizzuto, G., Libert, C. & Poli, V.** Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver. *Mol Cell Biol.* 21(5), 1621-1632 (2001).
131. **Schwerd, T., Twigg, S.R.F., Aschenbrenner, D., Manrique, S., Miller, K.A., Taylor, I.B., Capitani, M., McGowan, S.J., Sweeney, E., Weber, A., Chen, L., Bowness, P., Riordan, A., Cant, A., Freeman, A.F., Milner, J.D., Holland, S.M., Frede, N., Müller, M., Schmidt-Arras, D., Grimbacher, B., Wall, S.A., Jones, E.Y., Wilkie, A.O.M. & Uhlig, H.H.** A biallelic mutation in IL6ST encoding the GP130 co-receptor causes immunodeficiency and craniosynostosis. *J Exp Med.* 214(9), 2547-2562 (2017).
132. **Spencer, S., Köstel Bal, S., Egner, W., Lango Allen, H., Raza, S.I., Ma, C.A., Gürel, M., Zhang, Y., Sun, G., Sabroe, R.A., Greene, D., Rae, W., Shahin, T., Kania, K., Ardy, R.C., Thian, M., Staples, E., Pecchia-Bekkum, A., Worrall, W.P.M., Stephens, J., Brown, M., Tuna, S., York, M., Shackley, F., Kerrin, D., Sargur, R., Condliffe, A., Tipu, H.N., Kuehn, H.S., Rosenzweig, S.D., Turro, E., Tavaré, S., Thrasher, A.J., Jodrell, D.I., Smith, K.G.C., Boztug, K., Milner, J.D. & Thaventhiran, J.E.D.** Loss of the interleukin-6 receptor causes immunodeficiency, atopy, and abnormal inflammatory responses. *J Exp Med.* 216(9), 1986-1998 (2019).
133. **Uhlar, C.M. & Whitehead, A.S.** Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem.* 265(2), 501-523 (1999).
134. **De Buck, M., Gouwy, M., Wang, J.M., Van Snick, J., Opdenakker, G., Struyf, S. & Van Damme, J.** Structure and Expression of Different Serum Amyloid A (SAA) Variants and their Concentration-Dependent Functions During Host Insults. *Curr Med Chem.* 23(17), 1725-1755 (2016).

135. **Husby, G., Marhaug, G., Dowtor, B., Sletten, K. & Sipe, J.D.** Serum amyloid A (SAA): Biochemistry, genetics and the pathogenesis of AA amyloidosis. *Amyloid.* 1(2), 119-137 (1994).
136. **Jensen, L.E. & Whitehead, A.S.** Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochem J.* 334(Pt 3), 489-503 (1998).
137. **Whitehead, A.S., de Beer, M.C., Steel, D.M., Rits, M., Lelias, J.M., Lane, W.S. & de Beer, F.C.** Identification of novel members of the serum amyloid A protein superfamily as constitutive apolipoproteins of high density lipoprotein. *J Biol Chem.* 267(6), 3862-3867 (1992).
138. **de Beer, M.C., Yuan, T., Kindy, M.S., Asztalos, B.F., Roheim, P.S. & de Beer, F.C.** Characterization of constitutive human serum amyloid A protein (SAA4) as an apolipoprotein. *J Lipid Res.* 36(3), 526-534 (1995).
139. **Cheng, N., He, R., Tian, J., Ye, P.P. & Ye, R.D.** Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. *J Immunol.* 181(1), 22-26 (2008).
140. **Eklund, K.K., Niemi, K. & Kovanen, P.T.** Immune functions of serum amyloid A. *Crit Rev Immunol.* 32(4), 335-348 (2012).
141. **Su, S.B., Gong, W., Gao, J.L., Shen, W., Murphy, P.M., Oppenheim, J.J. & Wang, J.M.** A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. *J Exp Med.* 189(2), 395-402 (1999).
142. **Dong, Z., An, F., Wu, T., Zhang, C., Zhang, M., Zhang, Y., An, G. & An, F.** PTX3, a key component of innate immunity, is induced by SAA via FPRL1-mediated signaling in HAECS. *J Cell Biochem.* 112(8), 2097-2105 (2011).
143. **Baranova, I.N., Bocharov, A.V., Vishnyakova, T.G., Kurlander, R., Chen, Z., Fu, D., Arias, I.M., Csako, G., Patterson, A.P. & Eggerman, T.L.** CD36 is a novel serum amyloid A (SAA) receptor mediating SAA binding and SAA-induced signaling in human and rodent cells. *J Biol Chem.* 285(11), 8492-8506 (2010).
144. **Niemi, K., Teirilä, L., Lappalainen, J., Rajamäki, K., Baumann, M.H., Öörni, K., Wolff, H., Kovanen, P.T., Matikainen, S. & Eklund, K.K.** Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome via P2X7 receptor and a cathepsin B-sensitive pathway. *J Immunol.* 186(11), 6119-6128 (2011).
145. **Banka, C.L., Yuan, T., de Beer, M.C., Kindy, M., Curtiss, L.K. & de Beer, F.C.** Serum amyloid A (SAA): influence on HDL-mediated cellular cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 36(5), 1058-1065 (1995).
146. **Malle, E. & De Beer, F.C.** Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice. *Eur J Clin Invest.* 26(6), 427-435 (1996).

147. **Badolato, R., Wang, J.M., Murphy, W.J., Lloyd, A.R., Michiel, D.F., Bausserman, L.L., Kelvin, D.J. & Oppenheim, J.J.** Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med.* 180(1), 203-209 (1994).
148. **Patel, H., Fellowes, R., Coade, S. & Woo, P.** Human serum amyloid A has cytokine-like properties. *Scand J Immunol.* 48(4), 410-418 (1998).
149. **Gillmore, J.D., Lovat, L.B., Persey, M.R., Pepys, M.B. & Hawkins, P.N.** Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet.* 358(9275), 24-29 (2001).
150. **Westerman, G.T., Fändrich, M. & Westerman, P.** AA amyloidosis: pathogenesis and targeted therapy. *Annu Rev Pathol.* 10, 321-344 (2015).
151. **Chiti, F. & Dobson, C.M.** Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem.* 75, 333-366 (2006).
152. **Röcken, C. & Shakespeare, A.** Pathology, diagnosis and pathogenesis of AA amyloidosis. *Virchows Arch.* 440(2), 111-122 (2002).
153. **Claus, S., Meinhardt, K., Aumüller, T., Puscalau-Girtu, I., Linder, J., Haupt, C., Walther, P., Syrovets, T., Simmet, T. & Fändrich, M.** Cellular mechanism of fibril formation from serum amyloid A1 protein. *EMBO Rep.* 18(8), 1352-1366 (2017).
154. **Merlini, G. & Bellotti, V.** Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med.* 349(6), 583-596 (2003).
155. **Eisenberg, D. & Jucker, M.** The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell.* 148(6), 1188-1203 (2012).
156. **Westerman, P., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Cohen, A.S., Frangione, B., Ikeda, S., Masters, C.L., Merlini, G., Saraiva, M.J. & Sipe, J.D.** A primer of amyloid nomenclature. *Amyloid.* 14(3), 179-183 (2007).
157. **Hazenberg, B.P., van, G., II, Bijzet, J., Jager, P.L. & van Rijswijk, M.H.** Diagnostic and therapeutic approach of systemic amyloidosis. *Neth J Med.* 62(4), 121-128 (2004).
158. **van der Flier, L.G. & Clevers, H.** Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* 71, 241-260 (2009).
159. **Van der Flier, L.G., Sabates-Bellver, J., Oving, I., Haegebarth, A., De Palo, M., Anti, M., Van Gijn, M.E., Suijkerbuijk, S., Van de Wetering, M., Marra, G. & Clevers, H.** The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology.* 132(2), 628-632 (2007).
160. **Van der Flier, L.G., Van Gijn, M.E., Hatzis, P., Kujala, P., Haegebarth, A., Stange, D.E., Begthel, H., van den Born, M., Guryev, V., Oving, I., Van Es, J.H., Barker, N., Peters,**

- P.J., Van de Wetering, M. & Clevers, H.** Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate. *Cell.* 136(5), 903-912 (2009).
161. **Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegeman, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J. & Clevers, H.** Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature.* 449(7165), 1003-1007 (2007).
162. **Potten, C.S., Booth, C. & Pritchard, D.M.** The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol.* 78(4), 219-243 (1997).
163. **Maddaus, M.A., Wells, C.L., Platt, J.L., Condie, R.M. & Simmons, R.L.** Effect of T cell modulation on the translocation of bacteria from the gut and mesenteric lymph node. *Ann Surg.* 207(4), 387-398 (1988).
164. **Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M. & Clevers, H.** Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature.* 469(7330), 415-418 (2011).
165. **Mei, X., Gu, M. & Li, M.** Plasticity of Paneth cells and their ability to regulate intestinal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 11(1), 349 (2020).
166. **Hall, P.A., Coates, P.J., Ansari, B. & Hopwood, D.** Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci.* 107(Pt 12), 3569-3577 (1994).
167. **Kim, Y.S. & Ho, S.B.** Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep.* 12(5), 319-330 (2010).
168. **Erben, U., Lodenkemper, C., Doerfel, K., Spieckermann, S., Haller, D., Heimesaat, M.M., Zeitz, M., Siegmund, B. & Kühl, A.A.** A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int J Clin Exp Pathol.* 7(8), 4557-4576 (2014).
169. **McGuckin, M.A., Eri, R., Simms, L.A., Florin, T.H. & Radford-Smith, G.** Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 15(1), 100-113 (2009).
170. **Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K. & Littman, D.R.** Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell.* 139(3), 485-498 (2009).
171. **Strober, W., Fuss, I. & Mannon, P.** The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 117(3), 514-521 (2007).
172. **Baumgart, D.C. & Sandborn, W.J.** Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet.* 369(9573), 1641-1657 (2007).

173. **Danese, S. & Fiocchi, C.** Ulcerative colitis. *N Engl J Med.* 365(18), 1713-1725 (2011).
174. **Loftus, C.G., Loftus, E.V., Jr., Harmsen, W.S., Zinsmeister, A.R., Tremaine, W.J., Melton, L.J., 3rd & Sandborn, W.J.** Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis.* 13(3), 254-261 (2007).
175. **Khor, B., Gardet, A. & Xavier, R.J.** Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 474(7351), 307-317 (2011).
176. **Buhner, S., Buning, C., Genschel, J., Kling, K., Herrmann, D., Dignass, A., Kuechler, I., Krueger, S., Schmidt, H.H. & Lochs, H.** Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut.* 55(3), 342-347 (2006).
177. **Xavier, R.J. & Podolsky, D.K.** Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 448(7152), 427-434 (2007).
178. **Hanauer, S.B. & Sandborn, W.** Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol.* 96(3), 635-643 (2001).
179. **Wilkins, T., Jarvis, K. & Patel, J.** Diagnosis and management of Crohn's disease. *Am Fam Physician.* 84(12), 1365-1375 (2011).
180. **Nikolaus, S. & Schreiber, S.** Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 133(5), 1670-1689 (2007).
181. **Bentley, E., Jenkins, D., Campbell, F. & Warren, B.** How could pathologists improve the initial diagnosis of colitis? Evidence from an international workshop. *J Clin Pathol.* 55(12), 955-960 (2002).
182. **Schultze, J.L. & Rosenstiel, P.** Systems Medicine in Chronic Inflammatory Diseases. *Immunity.* 48(4), 608-613 (2018).
183. **Neurath, M.F.** Targeting immune cell circuits and trafficking in inflammatory bowel disease. *Nat Immunol.* 20(8), 970-979 (2019).
184. **Hue, S., Ahern, P., Buonocore, S., Kullberg, M.C., Cua, D.J., McKenzie, B.S., Powrie, F. & Maloy, K.J.** Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med.* 203(11), 2473-2483 (2006).
185. **Yen, D., Cheung, J., Scheerens, H., Poulet, F., McClanahan, T., McKenzie, B., Kleinschek, M.A., Owyang, A., Mattson, J., Blumenschein, W., Murphy, E., Sathe, M., Cua, D.J., Kastelein, R.A. & Rennick, D.** IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest.* 116(5), 1310-1316 (2006).

186. **Brand, S., Beigel, F., Olszak, T., Zitzmann, K., Eichhorst, S.T., Otte, J.M., Diepolder, H., Marquardt, A., Jagla, W., Popp, A., Leclair, S., Herrmann, K., Seiderer, J., Ochsenkühn, T., Göke, B., Auernhammer, C.J. & Dambacher, J.** IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 290(4), G827-838 (2006).
187. **Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. & Jemal, A.** Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 65(2), 87-108 (2015).
188. **Sakamoto, N., Kono, S., Wakai, K., Fukuda, Y., Satomi, M., Shimoyama, T., Inaba, Y., Miyake, Y., Sasaki, S., Okamoto, K., Kobashi, G., Washio, M., Yokoyama, T., Date, C. & Tanaka, H.** Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis.* 11(2), 154-163 (2005).
189. **Yadav, P., Ellinghaus, D., Rémy, G., Freitag-Wolf, S., Cesaro, A., Degenhardt, F., Boucher, G., Delacre, M., Peyrin-Biroulet, L., Pichavant, M., Rioux, J.D., Gosset, P., Franke, A., Schumm, L.P., Krawczak, M., Chamaillard, M., Dempfle, A. & Andersen, V.** Genetic Factors Interact With Tobacco Smoke to Modify Risk for Inflammatory Bowel Disease in Humans and Mice. *Gastroenterology.* 153(2), 550-565 (2017).
190. **DeSantis, C.E., Lin, C.C., Mariotto, A.B., Siegel, R.L., Stein, K.D., Kramer, J.L., Alteri, R., Robbins, A.S. & Jemal, A.** Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 64(4), 252-271 (2014).
191. **Jiang, Y., Ben, Q., Shen, H., Lu, W., Zhang, Y. & Zhu, J.** Diabetes mellitus and incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Epidemiol.* 26(11), 863-876 (2011).
192. **Rowan, A.J., Lamlum, H., Ilyas, M., Wheeler, J., Straub, J., Papadopoulou, A., Bicknell, D., Bodmer, W.F. & Tomlinson, I.P.** APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(7), 3352-3357 (2000).
193. **Russo, A., Bazan, V., Iacopetta, B., Kerr, D., Soussi, T. & Gebbia, N.** The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol.* 23(30), 7518-7528 (2005).
194. **Henderson, B.R.** Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol.* 2(9), 653-660 (2000).
195. **Biernz, M. & Clevers, H.** Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell.* 103(2), 311-320 (2000).
196. **He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B. & Kinzler, K.W.** Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 281(5382), 1509-1512 (1998).

197. **Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R. & Ben-Ze'ev, A.** The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96(10), 5522-5527 (1999).
198. **Aoki, K. & Taketo, M.M.** Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci*. 120(Pt 19), 3327-3335 (2007).
199. **Fodde, R., Smits, R. & Clevers, H.** APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 1(1), 55-67 (2001).
200. **Sansom, O.J., Reed, K.R., Hayes, A.J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I.P., Battle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I.S., Clarke, A.R. & Winton, D.J.** Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev*. 18(12), 1385-1390 (2004).
201. **Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B. & Kinzler, K.W.** APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*. 359(6392), 235-237 (1992).
202. **Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., van Es, J.H., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R.H. & Clevers, H.** Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol*. 3(4), 433-438 (2001).
203. **Worthley, D.L., Whitehall, V.L., Spring, K.J. & Leggett, B.A.** Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol*. 13(28), 3784-3791 (2007).
204. **Riley, T., Sontag, E., Chen, P. & Levine, A.** Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(5), 402-412 (2008).
205. **Muller, P.A. & Vousden, K.H.** p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol*. 15(1), 2-8 (2013).
206. **Cooks, T., Harris, C.C. & Oren, M.** Caught in the cross fire: p53 in inflammation. *Carcinogenesis*. 35(8), 1680-1690 (2014).
207. **Levine, A.J.** The many faces of p53: something for everyone. *J Mol Cell Biol*. 11(7), 524-530 (2019).
208. **Grivennikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M.** Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 140(6), 883-899 (2010).
209. **Mager, L.F., Wasmer, M.H., Rau, T.T. & Krebs, P.** Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 6, 96 (2016).
210. **Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.W., Egan, L.J., Kagnoff, M.F. & Karin, M.** IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 118(3), 285-296 (2004).

211. **Balkwill, F.** Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer.* 9(5), 361-371 (2009).
212. **Hamilton, K.E., Simmons, J.G., Ding, S., Van Landeghem, L. & Lund, P.K.** Cytokine induction of tumor necrosis factor receptor 2 is mediated by STAT3 in colon cancer cells. *Mol Cancer Res.* 9(12), 1718-1731 (2011).
213. **Kortylewski, M., Xin, H., Kujawski, M., Lee, H., Liu, Y., Harris, T., Drake, C., Pardoll, D. & Yu, H.** Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 15(2), 114-123 (2009).
214. **Wang, L., Yi, T., Kortylewski, M., Pardoll, D.M., Zeng, D. & Yu, H.** IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med.* 206(7), 1457-1464 (2009).
215. **Komoda, H., Tanaka, Y., Honda, M., Matsuo, Y., Hazama, K. & Takao, T.** Interleukin-6 levels in colorectal cancer tissues. *World J Surg.* 22(8), 895-898 (1998).
216. **Chung, Y.C. & Chang, Y.F.** Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 83(4), 222-226 (2003).
217. **West, N.R., McCuaig, S., Franchini, F. & Powrie, F.** Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nat Rev Immunol.* 15(10), 615-629 (2015).
218. **Neufert, C., Becker, C. & Neurath, M.F.** An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc.* 2(8), 1998-2004 (2007).
219. **De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M.L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E. & Fazio, V.M.** The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog.* 10, 9 (2011).
220. **Becker, C., Fantini, M.C., Schramm, C., Lehr, H.A., Wirtz, S., Nikolaev, A., Burg, J., Strand, S., Kiesslich, R., Huber, S., Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Galle, P.R., Blessing, M., Rose-John, S. & Neurath, M.F.** TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity.* 21(4), 491-501 (2004).
221. **Bollrath, J., Phesse, T.J., von Burstin, V.A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, O., Schwitalla, S., Matthews, V., Schmid, R.M., Kirchner, T., Arkan, M.C., Ernst, M. & Greten, F.R.** gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell.* 15(2), 91-102 (2009).
222. **Niederreiter, L., Fritz, T.M., Adolph, T.E., Krismer, A.M., Offner, F.A., Tschurtschenthaler, M., Flak, M.B., Hosomi, S., Tomczak, M.F., Kaneider, N.C., Sarcevic, E., Kempster, S.L., Raine, T., Esser, D., Rosenstiel, P., Kohno, K., Iwawaki, T., Tilg, H., Blumberg, R.S. & Kaser, A.** ER stress transcription factor Xbp1 suppresses intestinal tumorigenesis and directs intestinal stem cells. *J Exp Med.* 210(10), 2041-2056 (2013).

223. **Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B. & Neurath, M.F.** Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc.* 2(3), 541-546 (2007).
224. **Moolenbeek, C. & Ruitenberg, E.J.** The "Swiss roll": a simple technique for histological studies of the rodent intestine. *Lab Anim.* 15(1), 57-59 (1981).
225. **Faget, L. & Hnasko, T.S.** Tyramide Signal Amplification for Immunofluorescent Enhancement. *Methods Mol Biol.* 1318, 161-172 (2015).
226. **Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S.** IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatol.* 64(6), 1403-1415 (2016).
227. **Schumacher, N., Yan, K., Gandraß, M., Müller, M., Krisp, C., Hässler, R., Carambia, A., Nofer, J.R., Bernardes, J.P., Khouja, M., Thomsen, I., Chalupsky, K., Bolik, J., Hölscher, C., Wunderlich, T., Herkel, J., Rosenstiel, P., Schramm, C., Schlüter, H., Renné, T., Mittrücker, H.W., Rose-John, S. & Schmidt-Arras, D.** Cell-autonomous hepatocyte-specific GP130 signaling is sufficient to trigger a robust innate immune response in mice. *J Hepatol.* 74(2), 407-418 (2021).
228. **Sano, T., Huang, W., Hall, J.A., Yang, Y., Chen, A., Gavzy, S.J., Lee, J.Y., Ziel, J.W., Miraldi, E.R., Domingos, A.I., Bonneau, R. & Littman, D.R.** An IL-23R/IL-22 Circuit Regulates Epithelial Serum Amyloid A to Promote Local Effector Th17 Responses. *Cell.* 163(2), 381-393 (2015).
229. **Atarashi, K., Tanoue, T., Ando, M., Kamada, N., Nagano, Y., Narushima, S., Suda, W., Imaoka, A., Setoyama, H., Nagamori, T., Ishikawa, E., Shima, T., Hara, T., Kado, S., Jinnohara, T., Ohno, H., Kondo, T., Toyooka, K., Watanabe, E., Yokoyama, S., Tokoro, S., Mori, H., Noguchi, Y., Morita, H., Ivanov, II, Sugiyama, T., Nuñez, G., Camp, J.G., Hattori, M., Umesaki, Y. & Honda, K.** Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell.* 163(2), 367-380 (2015).
230. **Song, F., Ito, K., Denning, T.L., Kuninger, D., Papaconstantinou, J., Gourley, W., Klimpel, G., Balish, E., Hokanson, J. & Ernst, P.B.** Expression of the neutrophil chemokine KC in the colon of mice with enterocolitis and by intestinal epithelial cell lines: effects of flora and proinflammatory cytokines. *J Immunol.* 162(4), 2275-2280 (1999).
231. **Peters, M., Schirmacher, P., Goldschmitt, J., Odenthal, M., Peschel, C., Fattori, E., Ciliberto, G., Dienes, H.P., Meyer zum Büschenfelde, K.H. & Rose-John, S.** Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in interleukin (IL)-6-sIL-6R double transgenic mice. *J Exp Med.* 185(4), 755-766 (1997).
232. **Osho, S.O., Wang, T., Horn, N.L. & Adeola, O.** Comparison of goblet cell staining methods in jejunal mucosa of turkey poult. *Poult Sci.* 96(3), 556-559 (2017).
233. **Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y. & Nakaya, R.** A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology.* 98(3), 694-702 (1990).

234. **Laroui, H., Ingersoll, S.A., Liu, H.C., Baker, M.T., Ayyadurai, S., Charania, M.A., Laroui, F., Yan, Y., Sitaraman, S.V. & Merlin, D.** Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. *PLoS One.* 7(3), e32084 (2012).
235. **Cooper, H.S., Murthy, S.N., Shah, R.S. & Sedergran, D.J.** Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest.* 69(2), 238-249 (1993).
236. **Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Nakagama, H. & Tanaka, T.** Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis.* 27(1), 162-169 (2006).
237. **Yarur, A.J., Quintero, M.A., Jain, A., Czul, F., Barkin, J.S. & Abreu, M.T.** Serum Amyloid A as a Surrogate Marker for Mucosal and Histologic Inflammation in Patients with Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 23(1), 158-164 (2017).
238. **Niederau, C., Backmerhoff, F., Schumacher, B. & Niederau, C.** Inflammatory mediators and acute phase proteins in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology.* 44(13), 90-107 (1997).
239. **Gutfeld, O., Prus, D., Ackerman, Z., Dishon, S., Linke, R.P., Levin, M. & Urieli-Shoval, S.** Expression of serum amyloid A, in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa: implication for a role in colonic tumorigenesis. *J Histochem Cytochem.* 54(1), 63-73 (2006).
240. **Køstner, A.H., Kersten, C., Löwenmark, T., Ydsten, K.A., Peltonen, R., Isoniemi, H., Haglund, C., Gunnarsson, U. & Isaksson, B.** The prognostic role of systemic inflammation in patients undergoing resection of colorectal liver metastases: C-reactive protein (CRP) is a strong negative prognostic biomarker. *J Surg Oncol.* 114(7), 895-899 (2016).
241. **Park, J.H., Fuglestad, A.J., Køstner, A.H., Oliwa, A., Graham, J., Horgan, P.G., Roxburgh, C.S.D., Kersten, C. & McMillan, D.C.** Systemic Inflammation and Outcome in 2295 Patients with Stage I-III Colorectal Cancer from Scotland and Norway: First Results from the ScotScan Colorectal Cancer Group. *Ann Surg Oncol.* 27(8), 2784-2794 (2020).
242. **Køstner, A.H., Nielsen, P.S., Georgsen, J.B., Parner, E.T., Nielsen, M.B., Kersten, C. & Steiniche, T.** Systemic Inflammation Associates With a Myeloid Inflamed Tumor Microenvironment in Primary Resected Colon Cancer—May Cold Tumors Simply Be Too Hot? *Front Immunol.* 12, 716342 (2021).
243. **Parang, B., Barrett, C.W. & Williams, C.S.** AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer. *Methods Mol Biol.* 1422, 297-307 (2016).
244. **Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J.** The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 12(4), 298-306 (2012).
245. **De Simone, V., Pallone, F., Monteleone, G. & Stolfi, C.** Role of T(H)17 cytokines in the control of colorectal cancer. *Oncoimmunology.* 2(12), e26617 (2013).

246. **Lomas, D.A.** The selective advantage of alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 173(10), 1072-1077 (2006).
247. **Sander, L.E., Sackett, S.D., Dierssen, U., Beraza, N., Linke, R.P., Müller, M., Blander, J.M., Tacke, F. & Trautwein, C.** Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med.* 207(7), 1453-1464 (2010).
248. **He, R., Sang, H. & Ye, R.D.** Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. *Blood.* 101(4), 1572-1581 (2003).
249. **Roh, Y.S., Zhang, B., Loomba, R. & Seki, E.** TLR2 and TLR9 contribute to alcohol-mediated liver injury through induction of CXCL1 and neutrophil infiltration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 309(1), G30-41 (2015).
250. **Bigorgne, A.E., John, B., Ebrahimkhani, M.R., Shimizu-Albergine, M., Campbell, J.S. & Crispe, I.N.** TLR4-Dependent Secretion by Hepatic Stellate Cells of the Neutrophil-Chemoattractant CXCL1 Mediates Liver Response to Gut Microbiota. *PLoS One.* 11(3), e0151063 (2016).
251. **Kobayashi, S.D. & DeLeo, F.R.** Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 1(3), 309-333 (2009).
252. **Kolaczkowska, E. & Kubes, P.** Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 13(3), 159-175 (2013).
253. **Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C. & Jaillon, S.** Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 11(8), 519-531 (2011).
254. **Nathan, C.** Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 6(3), 173-182 (2006).
255. **Borregaard, N.** Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* 33(5), 657-670 (2010).
256. **Korkmaz, B., Poutrain, P., Hazouard, E., de Monte, M., Attucci, S. & Gauthier, F.L.** Competition between elastase and related proteases from human neutrophil for binding to alpha1-protease inhibitor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 32(6), 553-559 (2005).
257. **Janciauskiene, S.M., Bals, R., Koczulla, R., Vogelmeier, C., Köhnlein, T. & Welte, T.** The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respir Med.* 105(8), 1129-1139 (2011).
258. **Fairbanks, K.D. & Tavill, A.S.** Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: a review. *Am J Gastroenterol.* 103(8), 2136-2141 (2008).

259. **Tuder, R.M., Janciauskiene, S.M. & Petrache, I.** Lung disease associated with alpha1-antitrypsin deficiency. *Proc Am Thorac Soc.* 7(6), 381-386 (2010).
260. **Liaskou, E., Wilson, D.V. & Oo, Y.H.** Innate immune cells in liver inflammation. *Mediators Inflamm.* 2012, 949157 (2012).
261. **Strey, C.W., Markiewski, M., Mastellos, D., Tudoran, R., Spruce, L.A., Greenbaum, L.E. & Lambris, J.D.** The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J Exp Med.* 198(6), 913-923 (2003).
262. **Taub, R.** Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. *Faseb j.* 10(4), 413-427 (1996).
263. **Min, J.S., DeAngelis, R.A., Reis, E.S., Gupta, S., Maurya, M.R., Evans, C., Das, A., Burant, C., Lambris, J.D. & Subramaniam, S.** Systems Analysis of the Complement-Induced Priming Phase of Liver Regeneration. *J Immunol.* 197(6), 2500-2508 (2016).
264. **Markiewski, M.M., Mastellos, D., Tudoran, R., DeAngelis, R.A., Strey, C.W., Franchini, S., Wetsel, R.A., Erdei, A. & Lambris, J.D.** C3a and C3b activation products of the third component of complement (C3) are critical for normal liver recovery after toxic injury. *J Immunol.* 173(2), 747-754 (2004).
265. **Glatz, J.F. & van der Vusse, G.J.** Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res.* 35(3), 243-282 (1996).
266. **Evans, W.J., Morley, J.E., Argilés, J., Bales, C., Baracos, V., Guttridge, D., Jatoi, A., Kalantar-Zadeh, K., Lochs, H., Mantovani, G., Marks, D., Mitch, W.E., Muscaritoli, M., Najand, A., Ponikowski, P., Rossi Fanelli, F., Schambelan, M., Schols, A., Schuster, M., Thomas, D., Wolfe, R. & Anker, S.D.** Cachexia: a new definition. *Clin Nutr.* 27(6), 793-799 (2008).
267. **Fearon, K., Strasser, F., Anker, S.D., Bosaeus, I., Bruera, E., Fainsinger, R.L., Jatoi, A., Loprinzi, C., MacDonald, N., Mantovani, G., Davis, M., Muscaritoli, M., Ottery, F., Radbruch, L., Ravasco, P., Walsh, D., Wilcock, A., Kaasa, S. & Baracos, V.E.** Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol.* 12(5), 489-495 (2011).
268. **Tisdale, M.J.** Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev.* 89(2), 381-410 (2009).
269. **Fearon, K., Arends, J. & Baracos, V.** Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. *Nat Rev Clin Oncol.* 10(2), 90-99 (2013).
270. **Carson, J.A. & Baltgalvis, K.A.** Interleukin 6 as a key regulator of muscle mass during cachexia. *Exerc Sport Sci Rev.* 38(4), 168-176 (2010).
271. **Petersen, E.W., Carey, A.L., Sacchetti, M., Steinberg, G.R., Macaulay, S.L., Febbraio, M.A. & Pedersen, B.K.** Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans

- in vivo and in tissue culture in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288(1), E155-162 (2005).
272. **Zuidgeest-van Leeuwen, S.D., van den Berg, J.W., Wattimena, J.L., van der Gaast, A., Swart, G.R., Wilson, J.H. & Dagnelie, P.C.** Lipolysis and lipid oxidation in weight-losing cancer patients and healthy subjects. *Metabolism.* 49(7), 931-936 (2000).
273. **Agustsson, T., Rydén, M., Hoffstedt, J., van Harmelen, V., Dicker, A., Laurencikiene, J., Isaksson, B., Permert, J. & Arner, P.** Mechanism of increased lipolysis in cancer cachexia. *Cancer Res.* 67(11), 5531-5537 (2007).
274. **Rydén, M., Agustsson, T., Laurencikiene, J., Britton, T., Sjölin, E., Isaksson, B., Permert, J. & Arner, P.** Lipolysis--not inflammation, cell death, or lipogenesis--is involved in adipose tissue loss in cancer cachexia. *Cancer.* 113(7), 1695-1704 (2008).
275. **Dahlman, I., Mejhert, N., Linder, K., Agustsson, T., Mutch, D.M., Kulyte, A., Isaksson, B., Permert, J., Petrovic, N., Nedergaard, J., Sjölin, E., Brodin, D., Clement, K., Dahlman-Wright, K., Rydén, M. & Arner, P.** Adipose tissue pathways involved in weight loss of cancer cachexia. *Br J Cancer.* 102(10), 1541-1548 (2010).
276. **Kelly, M., Keller, C., Avilucea, P.R., Keller, P., Luo, Z., Xiang, X., Giralt, M., Hidalgo, J., Saha, A.K., Pedersen, B.K. & Ruderman, N.B.** AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochem Biophys Res Commun.* 320(2), 449-454 (2004).
277. **Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T.O., Kohlwein, S.D., Haemmerle, G., Lass, A. & Madeo, F.** FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab.* 15(3), 279-291 (2012).
278. **Tsoli, M., Schweiger, M., Vanniasinghe, A.S., Painter, A., Zechner, R., Clarke, S. & Robertson, G.** Depletion of white adipose tissue in cancer cachexia syndrome is associated with inflammatory signaling and disrupted circadian regulation. *PLoS One.* 9(3), e92966 (2014).
279. **Ebadi, M. & Mazurak, V.C.** Evidence and mechanisms of fat depletion in cancer. *Nutrients.* 6(11), 5280-5297 (2014).
280. **Strassmann, G., Fong, M., Kenney, J.S. & Jacob, C.O.** Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J Clin Invest.* 89(5), 1681-1684 (1992).
281. **Bonetto, A., Aydogdu, T., Jin, X., Zhang, Z., Zhan, R., Puzis, L., Koniaris, L.G. & Zimmers, T.A.** JAK/STAT3 pathway inhibition blocks skeletal muscle wasting downstream of IL-6 and in experimental cancer cachexia. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 303(3), E410-421 (2012).
282. **de Man, F.H., de Beer, F., van der Laarse, A., Smelt, A.H. & Havekes, L.M.** Lipolysis of very low density lipoproteins by heparan sulfate proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Lipid Res.* 38(12), 2465-2472 (1997).

283. **MacArthur, J.M., Bishop, J.R., Stanford, K.I., Wang, L., Bensadoun, A., Witztum, J.L. & Esko, J.D.** Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *J Clin Invest.* 117(1), 153-164 (2007).
284. **Mulder, M., Lombardi, P., Jansen, H., van Berkel, T.J., Frants, R.R. & Havekes, L.M.** Low density lipoprotein receptor internalizes low density and very low density lipoproteins that are bound to heparan sulfate proteoglycans via lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 268(13), 9369-9375 (1993).
285. **Mahley, R.W. & Ji, Z.S.** Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res.* 40(1), 1-16 (1999).
286. **Alquraini, A., Garguilo, S., D'Souza, G., Zhang, L.X., Schmidt, T.A., Jay, G.D. & Elsaid, K.A.** The interaction of lubricin/proteoglycan 4 (PRG4) with toll-like receptors 2 and 4: an anti-inflammatory role of PRG4 in synovial fluid. *Arthritis Res Ther.* 17, 353 (2015).
287. **Al-Sharif, A., Jamal, M., Zhang, L.X., Larson, K., Schmidt, T.A., Jay, G.D. & Elsaid, K.A.** Lubricin/Proteoglycan 4 Binding to CD44 Receptor: A Mechanism of the Suppression of Proinflammatory Cytokine-Induced Synoviocyte Proliferation by Lubricin. *Arthritis Rheumatol.* 67(6), 1503-1513 (2015).
288. **Iqbal, S.M., Leonard, C., Regmi, S.C., De Rantere, D., Tailor, P., Ren, G., Ishida, H., Hsu, C., Abubacker, S., Pang, D.S., Salo, P.T., Vogel, H.J., Hart, D.A., Waterhouse, C.C., Jay, G.D., Schmidt, T.A. & Krawetz, R.J.** Lubricin/Proteoglycan 4 binds to and regulates the activity of Toll-Like Receptors In Vitro. *Sci Rep.* 6, 18910 (2016).
289. **Novince, C.M., Koh, A.J., Michalski, M.N., Marchesan, J.T., Wang, J., Jung, Y., Berry, J.E., Eber, M.R., Rosol, T.J., Taichman, R.S. & McCauley, L.K.** Proteoglycan 4, a novel immunomodulatory factor, regulates parathyroid hormone actions on hematopoietic cells. *Am J Pathol.* 179(5), 2431-2442 (2011).
290. **Simons, J.P., Al-Shawi, R., Ellmerich, S., Speck, I., Aslam, S., Hutchinson, W.L., Mangione, P.P., Disterer, P., Gilbertson, J.A., Hunt, T., Millar, D.J., Minogue, S., Bodin, K., Pepys, M.B. & Hawkins, P.N.** Pathogenetic mechanisms of amyloid A amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110(40), 16115-16120 (2013).
291. **Cheng, N., Liang, Y., Du, X. & Ye, R.D.** Serum amyloid A promotes LPS clearance and suppresses LPS-induced inflammation and tissue injury. *EMBO Rep.* 19(10), (2018).
292. **Migeotte, I., Communi, D. & Parmentier, M.** Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17(6), 501-519 (2006).
293. **Cai, L., de Beer, M.C., de Beer, F.C. & van der Westhuyzen, D.R.** Serum amyloid A is a ligand for scavenger receptor class B type I and inhibits high density lipoprotein binding and selective lipid uptake. *J Biol Chem.* 280(4), 2954-2961 (2005).

294. **Belmokhtar, K., Robert, T., Ortillon, J., Braconnier, A., Vuiblet, V., Boulagnon-Rombi, C., Diebold, M.D., Pietrement, C., Schmidt, A.M., Rieu, P. & Touré, F.** Signaling of Serum Amyloid A Through Receptor for Advanced Glycation End Products as a Possible Mechanism for Uremia-Related Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 36(5), 800-809 (2016).
295. **El Kebir, D., József, L., Khreiss, T., Pan, W., Petasis, N.A., Serhan, C.N. & Filep, J.G.** Aspirin-triggered lipoxins override the apoptosis-delaying action of serum amyloid A in human neutrophils: a novel mechanism for resolution of inflammation. *J Immunol.* 179(1), 616-622 (2007).
296. **Sun, L., Zhou, H., Zhu, Z., Yan, Q., Wang, L., Liang, Q. & Ye, R.D.** Ex vivo and in vitro effect of serum amyloid a in the induction of macrophage M2 markers and efferocytosis of apoptotic neutrophils. *J Immunol.* 194(10), 4891-4900 (2015).
297. **Ramachandran, P., Pellicoro, A., Vernon, M.A., Boulter, L., Aucott, R.L., Ali, A., Hartland, S.N., Snowdon, V.K., Cappon, A., Gordon-Walker, T.T., Williams, M.J., Dunbar, D.R., Manning, J.R., van Rooijen, N., Fallowfield, J.A., Forbes, S.J. & Iredale, J.P.** Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109(46), E3186-3195 (2012).
298. **Dong, X., Liu, J., Xu, Y. & Cao, H.** Role of macrophages in experimental liver injury and repair in mice. *Exp Ther Med.* 17(5), 3835-3847 (2019).
299. **Liang, T.S., Wang, J.M., Murphy, P.M. & Gao, J.L.** Serum amyloid A is a chemotactic agonist at FPR2, a low-affinity N-formylpeptide receptor on mouse neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 270(2), 331-335 (2000).
300. **Christenson, K., Björkman, L., Tängemo, C. & Bylund, J.** Serum amyloid A inhibits apoptosis of human neutrophils via a P2X7-sensitive pathway independent of formyl peptide receptor-like 1. *J Leukoc Biol.* 83(1), 139-148 (2008).
301. **Okamoto, H., Katagiri, Y., Kiire, A., Momohara, S. & Kamatani, N.** Serum amyloid A activates nuclear factor-kappaB in rheumatoid synovial fibroblasts through binding to receptor of advanced glycation end-products. *J Rheumatol.* 35(5), 752-756 (2008).
302. **Michalopoulos, G.K. & Bhushan, B.** Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 18(1), 40-55 (2021).
303. **Malato, Y., Naqvi, S., Schürmann, N., Ng, R., Wang, B., Zape, J., Kay, M.A., Grimm, D. & Willenbring, H.** Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J Clin Invest.* 121(12), 4850-4860 (2011).
304. **Yanger, K., Knigin, D., Zong, Y., Maggs, L., Gu, G., Akiyama, H., Pikarsky, E. & Stanger, B.Z.** Adult hepatocytes are generated by self-duplication rather than stem cell differentiation. *Cell Stem Cell.* 15(3), 340-349 (2014).

305. **Hatting, M., Spannbauer, M., Peng, J., Al Masaoudi, M., Sellge, G., Nevzorova, Y.A., Gassler, N., Liedtke, C., Cubero, F.J. & Trautwein, C.** Lack of gp130 expression in hepatocytes attenuates tumor progression in the DEN model. *Cell Death Dis.* 6(3), e1667 (2015).
306. **Scherger, A.K., Al-Maarri, M., Maurer, H.C., Schick, M., Maurer, S., Öllinger, R., Gonzalez-Menendez, I., Martella, M., Thaler, M., Pechloff, K., Steiger, K., Sander, S., Ruland, J., Rad, R., Quintanilla-Martinez, L., Wunderlich, F.T., Rose-John, S. & Keller, U.** Activated gp130 signaling selectively targets B cell differentiation to induce mature lymphoma and plasmacytoma. *JCI Insight.* 4(15), (2019).
307. **Dhillon, V., Woo, P. & Isenberg, D.** Amyloidosis in the rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 48(8), 696-701 (1989).
308. **Obici, L., Raimondi, S., Lavatelli, F., Bellotti, V. & Merlini, G.** Susceptibility to AA amyloidosis in rheumatic diseases: a critical overview. *Arthritis Rheum.* 61(10), 1435-1440 (2009).
309. **Jumeau, C., Awad, F., Assrawi, E., Cobret, L., Duquesnoy, P., Giurgea, I., Valeyre, D., Grateau, G., Amselem, S., Bernaudin, J.F. & Karabina, S.A.** Expression of SAA1, SAA2 and SAA4 genes in human primary monocytes and monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* 14(5), e0217005 (2019).
310. **Teague, T.K., Marrack, P., Kappler, J.W. & Vella, A.T.** IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *J Immunol.* 158(12), 5791-5796 (1997).
311. **Ina, K., Itoh, J., Fukushima, K., Kusugami, K., Yamaguchi, T., Kyokane, K., Imada, A., Binion, D.G., Musso, A., West, G.A., Dobrea, G.M., McCormick, T.S., Lapetina, E.G., Levine, A.D., Ottaway, C.A. & Fiocchi, C.** Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol.* 163(2), 1081-1090 (1999).
312. **McGeachy, M.J., Chen, Y., Tato, C.M., Laurence, A., Joyce-Shaikh, B., Blumenschein, W.M., McClanahan, T.K., O'Shea, J.J. & Cua, D.J.** The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol.* 10(3), 314-324 (2009).
313. **Che Mat, N.F., Zhang, X., Guzzo, C. & Gee, K.** Interleukin-23-induced interleukin-23 receptor subunit expression is mediated by the Janus kinase/signal transducer and activation of transcription pathway in human CD4 T cells. *J Interferon Cytokine Res.* 31(4), 363-371 (2011).
314. **Grivennikov, S.I., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C.A., Schnabl, B., Jauch, D., Taniguchi, K., Yu, G.Y., Osterreicher, C.H., Hung, K.E., Datz, C., Feng, Y., Fearon, E.R., Oukka, M., Tessarollo, L., Coppola, V., Yarovinsky, F., Cheroutre, H., Eckmann, L., Trinchieri, G. & Karin, M.** Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature.* 491(7423), 254-258 (2012).

315. **Verreck, F.A., de Boer, T., Langenberg, D.M., Hoeve, M.A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R. & Ottenhoff, T.H.** Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(13), 4560-4565 (2004).
316. **He, R., Shepard, L.W., Chen, J., Pan, Z.K. & Ye, R.D.** Serum amyloid A is an endogenous ligand that differentially induces IL-12 and IL-23. *J Immunol.* 177(6), 4072-4079 (2006).
317. **Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J.S., Moore, K.W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J.F. & Kastelein, R.A.** Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 13(5), 715-725 (2000).
318. **Carmody, R.J., Ruan, Q., Liou, H.C. & Chen, Y.H.** Essential roles of c-Rel in TLR-induced IL-23 p19 gene expression in dendritic cells. *J Immunol.* 178(1), 186-191 (2007).
319. **Re, F. & Strominger, J.L.** Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem.* 276(40), 37692-37699 (2001).
320. **Napolitani, G., Rinaldi, A., Berthoni, F., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A.** Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol.* 6(8), 769-776 (2005).
321. **Kastelein, R.A., Hunter, C.A. & Cua, D.J.** Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol.* 25, 221-242 (2007).
322. **Maloy, K.J. & Kullberg, M.C.** IL-23 and Th17 cytokines in intestinal homeostasis. *Mucosal Immunol.* 1(5), 339-349 (2008).
323. **Li, Y., Jia, Y., Cui, T. & Zhang, J.** IL-6/STAT3 signaling pathway regulates the proliferation and damage of intestinal epithelial cells in patients with ulcerative colitis via H3K27ac. *Exp Ther Med.* 22(2), 890 (2021).
324. **Yang, S. & Yu, M.** Role of Goblet Cells in Intestinal Barrier and Mucosal Immunity. *J Inflamm Res.* 14, 3171-3183 (2021).
325. **Schürmann, G., Betzler, M., Post, S., Herfarth, C. & Meuer, S.** Soluble interleukin-2 receptor, interleukin-6 and interleukin-1 beta in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis: preoperative levels and postoperative changes of serum concentrations. *Digestion.* 51(1), 51-59 (1992).
326. **Raab, Y., Hällgren, R. & Gerdin, B.** Enhanced intestinal synthesis of interleukin-6 is related to the disease severity and activity in ulcerative colitis. *Digestion.* 55(1), 44-49 (1994).

327. **Tebbutt, N.C., Giraud, A.S., Inglese, M., Jenkins, B., Waring, P., Clay, F.J., Malki, S., Alderman, B.M., Grail, D., Hollande, F., Heath, J.K. & Ernst, M.** Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. *Nat Med.* 8(10), 1089-1097 (2002).
328. **Balestrieri, P., Ribolsi, M., Guarino, M.P.L., Emerenziani, S., Altomare, A. & Cicala, M.** Nutritional Aspects in Inflammatory Bowel Diseases. *Nutrients.* 12(2), (2020).
329. **Capristo, E., Addolorato, G., Mингrone, G., Greco, A.V. & Gasbarrini, G.** Effect of disease localization on the anthropometric and metabolic features of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 93(12), 2411-2419 (1998).
330. **Ensari, A.** The Malabsorption Syndrome and Its Causes and Consequences. in *Pathobiology of Human Disease.* 1266-1287 (2014).
331. **Rinawi, F., Iancu, T.C., Hartman, C., Cohen, H., Yarden-Bilavsky, H., Lev, M.R. & Shamir, R.** Fat malabsorption due to bile acid synthesis defect. *Isr Med Assoc J.* 17(3), 190-192 (2015).
332. **Hofmann, A.F. & Mysels, K.J.** Bile acid solubility and precipitation in vitro and in vivo: the role of conjugation, pH, and Ca²⁺ ions. *J Lipid Res.* 33(5), 617-626 (1992).
333. **Vítek, L.** Bile acid malabsorption in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 21(2), 476-483 (2015).
334. **Weisshof, R. & Chermesh, I.** Micronutrient deficiencies in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 18(6), 576-581 (2015).
335. **Hollander, D.** Permeability in Crohn's disease: altered barrier functions in healthy relatives? *Gastroenterology.* 104(6), 1848-1851 (1993).
336. **Riordan, S.M., McIver, C.J., Thomas, D.H., Duncombe, V.M., Bolin, T.D. & Thomas, M.C.** Luminal bacteria and small-intestinal permeability. *Scand J Gastroenterol.* 32(6), 556-563 (1997).
337. **Eckhardt, E.R., Witta, J., Zhong, J., Arsenescu, R., Arsenescu, V., Wang, Y., Ghoshal, S., de Beer, M.C., de Beer, F.C. & de Villiers, W.J.** Intestinal epithelial serum amyloid A modulates bacterial growth in vitro and pro-inflammatory responses in mouse experimental colitis. *BMC Gastroenterol.* 10, 133 (2010).
338. **Zenewicz, L.A., Antov, A. & Flavell, R.A.** CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. *Trends Mol Med.* 15(5), 199-207 (2009).
339. **Wilson, N.J., Boniface, K., Chan, J.R., McKenzie, B.S., Blumenschein, W.M., Mattson, J.D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., Lecron, J.C., Kastelein, R.A., Cua, D.J., McClanahan, T.K., Bowman, E.P. & de Waal Malefyt, R.** Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.* 8(9), 950-957 (2007).

340. **Gálvez, J.** Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. *ISRN Inflamm.* 2014 928461 (2014).
341. **Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T. & Fujiyama, Y.** Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut.* 52(1), 65-70 (2003).
342. **Seiderer, J., Elben, I., Diegelmann, J., Glas, J., Stallhofer, J., Tillack, C., Pfennig, S., Jürgens, M., Schmeichel, S., Konrad, A., Göke, B., Ochsenkühn, T., Müller-Myhsok, B., Lohse, P. & Brand, S.** Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 14(4), 437-445 (2008).
343. **Blaschitz, C. & Raffatellu, M.** Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. *J Clin Immunol.* 30(2), 196-203 (2010).
344. **Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S. & Nakae, S.** Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity.* 34(2), 149-162 (2011).
345. **Ogawa, A., Andoh, A., Araki, Y., Bamba, T. & Fujiyama, Y.** Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Immunol.* 110(1), 55-62 (2004).
346. **Yang, X.O., Chang, S.H., Park, H., Nurieva, R., Shah, B., Acero, L., Wang, Y.H., Schluns, K.S., Broaddus, R.R., Zhu, Z. & Dong, C.** Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med.* 205(5), 1063-1075 (2008).
347. **Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X. & Reinecker, H.C.** Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology.* 118(6), 1001-1011 (2000).
348. **Liu, Z., Yadav, P.K., Xu, X., Su, J., Chen, C., Tang, M., Lin, H., Yu, J., Qian, J., Yang, P.C. & Wang, X.** The increased expression of IL-23 in inflammatory bowel disease promotes intraepithelial and lamina propria lymphocyte inflammatory responses and cytotoxicity. *J Leukoc Biol.* 89(4), 597-606 (2011).
349. **Kvedaraite, E., Lourda, M., Ideström, M., Chen, P., Olsson-Åkefeldt, S., Forkel, M., Gavhed, D., Lindforss, U., Mjösberg, J., Henter, J.I. & Svensson, M.** Tissue-infiltrating neutrophils represent the main source of IL-23 in the colon of patients with IBD. *Gut.* 65(10), 1632-1641 (2016).
350. **Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., Sato, T., Sakuraba, A., Kitazume, M.T., Sugita, A., Koganei, K., Akagawa, K.S. & Hibi, T.** Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest.* 118(6), 2269-2280 (2008).
351. **Pascal, V., Pozuelo, M., Borruel, N., Casellas, F., Campos, D., Santiago, A., Martinez, X., Varela, E., Sarrabayrouse, G., Machiels, K., Vermeire, S., Sokol, H., Guarner, F. & Manichanh, C.** A microbial signature for Crohn's disease. *Gut.* 66(5), 813-822 (2017).

352. **Schmidt, C., Giese, T., Ludwig, B., Mueller-Molaian, I., Marth, T., Zeuzem, S., Meuer, S.C. & Stallmach, A.** Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 11(1), 16-23 (2005).
353. **Sakuraba, A., Sato, T., Kamada, N., Kitazume, M., Sugita, A. & Hibi, T.** Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 137(5), 1736-1745 (2009).
354. **Cox, J.H., Kljavin, N.M., Ota, N., Leonard, J., Roose-Girma, M., Diehl, L., Ouyang, W. & Ghilardi, N.** Opposing consequences of IL-23 signaling mediated by innate and adaptive cells in chemically induced colitis in mice. *Mucosal Immunol.* 5(1), 99-109 (2012).
355. **Neurath, M.F.** IL-23 in inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 45, 1-8 (2019).
356. **Naugler, W.E. & Karin, M.** The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med.* 14(3), 109-119 (2008).
357. **De Simone, V., Franzè, E., Ronchetti, G., Colantoni, A., Fantini, M.C., Di Fusco, D., Sica, G.S., Sileri, P., MacDonald, T.T., Pallone, F., Monteleone, G. & Stolfi, C.** Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- α synergistically activate STAT3 and NF- κ B to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene.* 34(27), 3493-3503 (2015).
358. **Waldner, M.J. & Neurath, M.F.** Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development. *Semin Immunol.* 26(1), 75-79 (2014).
359. **Davis, T.A., Conradie, D., Shridas, P., de Beer, F.C., Engelbrecht, A.M. & de Villiers, W.J.S.** Serum Amyloid A Promotes Inflammation-Associated Damage and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 12(4), 1329-1341 (2021).
360. **Malle, E., Sodin-Semrl, S. & Kovacevic, A.** Serum amyloid A: an acute-phase protein involved in tumour pathogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 66(1), 9-26 (2009).
361. **Ancsin, J.B. & Kisilevsky, R.** Laminin interactions with the apoproteins of acute-phase HDL: preliminary mapping of the laminin binding site on serum amyloid A. *Amyloid.* 6(1), 37-47 (1999).
362. **Ancsin, J.B. & Kisilevsky, R.** The heparin/heparan sulfate-binding site on apo-serum amyloid A. Implications for the therapeutic intervention of amyloidosis. *J Biol Chem.* 274(11), 7172-7181 (1999).
363. **Preciado-Patt, L., Levartowsky, D., Prass, M., Hershkoviz, R., Lider, O. & Fridkin, M.** Inhibition of cell adhesion to glycoproteins of the extracellular matrix by peptides corresponding to serum amyloid A. Toward understanding the physiological role of an enigmatic protein. *Eur J Biochem.* 223(1), 35-42 (1994).

364. **Urieli-Shoval, S., Shubinsky, G., Linke, R.P., Fridkin, M., Tabi, I. & Matzner, Y.** Adhesion of human platelets to serum amyloid A. *Blood*. 99(4), 1224-1229 (2002).
365. **Deryugina, E.I. & Quigley, J.P.** Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 25(1), 9-34 (2006).
366. **Lee, J. & Beatty, G.L.** Serum Amyloid A Proteins and Their Impact on Metastasis and Immune Biology in Cancer. *Cancers (Basel)*. 13(13), (2021).
367. **Salmon, H., Idoyaga, J., Rahman, A., Leboeuf, M., Remark, R., Jordan, S., Casanova-Acebes, M., Khudoyazanova, M., Agudo, J., Tung, N., Chakarov, S., Rivera, C., Hogstad, B., Bosenberg, M., Hashimoto, D., Gnjatic, S., Bhardwaj, N., Palucka, A.K., Brown, B.D., Brody, J., Ginhoux, F. & Merad, M.** Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity*. 44(4), 924-938 (2016).
368. **Chang, R.B. & Beatty, G.L.** The interplay between innate and adaptive immunity in cancer shapes the productivity of cancer immunosurveillance. *J Leukoc Biol.* 108(1), 363-376 (2020).
369. **van de Laar, L., Coffer, P.J. & Woltman, A.M.** Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood*. 119(15), 3383-3393 (2012).
370. **Palucka, K. & Banchereau, J.** Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer*. 12(4), 265-277 (2012).
371. **Kim, J.C., Jung, Y.S., Lee, H.Y., Park, J.S. & Bae, Y.S.** Serum amyloid A inhibits dendritic cell differentiation by suppressing GM-CSF receptor expression and signaling. *Exp Mol Med*. 49(8), e369 (2017).
372. **Teng, M.W., Bowman, E.P., McElwee, J.J., Smyth, M.J., Casanova, J.L., Cooper, A.M. & Cua, D.J.** IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med*. 21(7), 719-729 (2015).
373. **Mumm, J.B. & Oft, M.** Cytokine-based transformation of immune surveillance into tumor-promoting inflammation. *Oncogene*. 27(45), 5913-5919 (2008).
374. **Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E. & Karin, M.** Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 138(6), 2101-2114.e2105 (2010).

7 Appendix

7.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
AA	Amyloid A
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
AKT	Proteinkinase B
Alb	Albumin
AMPK	Adenosin-Monophosphat-Kinase
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
AOM	Azoxymethan
AP-1	Aktivator-Protein-1
APC	adenomatösen Polyposis coli
ApCs	<i>Amyloid P Component, Serum</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APP	Akut-Phase-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Ascl2	<i>achaete scute-like 2</i>
ATGL	Adipozyten-Triglyzerid-Lipase
BCA	Bicinchoninsäure
bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BSF	<i>B-cell stimulating factor</i>
BV	<i>brilliant violet</i>
B-Zellen	B-Lymphozyten
C3	<i>Complement C3</i>
CAC	<i>colitis-associated cancer</i>
CAG Promotor	Westphal Stop Kasette

CD	<i>Crohn´s disease</i>
CD36	Thrombozytenglykoprotein IV
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLC	cardiotropin-ähnliche Zytokine
CLEC4F	<i>C-Type Lectin Domain Family 4 Member F</i>
CNTF	<i>ciliary neurotropic factor</i>
CRC	<i>colorectal cancer</i>
CRP	C-reaktives Protein
CT-1	cardiotropin-1
CXCL1	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 1</i>
Cy7	Cyanin 7
D	Domäne
DABCO	1,4-Diazabicyclooctan
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
ddH2O	doppelt destilliertes Wasser
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLL1	<i>Delta-like canonical Notch ligand 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTE	1,4-Dithioerythrit
DSS	Dextran-Sodium-Sulfat
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure (<i>ethylen diamin tetraacetic acid</i>)
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated kinases</i>

EtOH	Ethanol
Fabp1	<i>Fatty Acid-Binding Protein 1</i>
FACS	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)
FCS	Fötales Rinderserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPRL1	Formylpeptidrezeptor 1
g	Gramm
gapdh	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Glu	Glutaminsäure
GM-CSF	<i>granulocyte / macrophage-colony-stimulating factor</i>
gp130	Glykoprotein 130 kDa
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
h	Stunde
HBSS	<i>Hanks balanced salt solution</i>
HCl	Salzsäure
HDL	<i>High-Density Lipoprotein</i>
H/E	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hes1	<i>Hairy and enhancer of split 1</i>
HGPG	HEPES, L-glutamine, penicillin/streptomycin, and gentamycin
Hpt	Haptoglobin
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
ICD	Intrazelluläre Domäne
IELs	Intraepitheliale Lymphozyten
IESC	Intestinale epitheliale Stammzellen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHCA	<i>inflammatory hepatocellular adenomas</i>
IκB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor</i>

IKK	I _K B Kinase
IL	Interleukin
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
iMCs	infiltrierende myeloische Zellen
i.p.	intraperitoneal
JAK	Janus Kinase
KC	Kupffer Zellen
kDa	Kilo Dalton
Ki-67	Kiel-67
kg	Kilogramm
L	Liter
Lgp130	Leuzin gp130
Lgr5	<i>Leucin rich motif G--protein coupled receptor-5</i>
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
LPCs	Lebervorläuferzellen
Ly6C	Lymphozyten-Antigen-6-Komplex, Locus C
M	molar
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i>
Mg	Milligramm
Min	Minuten
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metallopeptidase
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response protein MyD88</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaV	Natriumorthovanadat
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i>

OSM	Oncostatin M
P2X7	<i>Purinergic Receptor P2X 7</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelektrophorese
PAS	<i>periodic acid-Schiff</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>) mit Tween TM - 20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK1	<i>3'-phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimine
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PI-3Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₂	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP ₃	phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	polymorphonukleare Zellen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prg4	<i>Proteoglycan 4</i>
pSTAT1	phosphoryliertes STAT1
pSTAT3	phosphoryliertes STAT3
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Rezeptor
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
Reg3b	<i>Regenerating islet-derived protein 3-beta</i>
Reg3g	<i>Regenerating islet-derived protein 3-gamma</i>
RIPA Puffer	Radioimmunpräzipitationsassaypuffer
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i>
qRT-PCR	quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAA	Serum Amyloid A
Ser	Serin
SerpinA1	<i>Serpin Family A Member 1</i>
SH	<i>Src Homology</i>
SHP ₂	<i>Sry Homology Phosphotase 2</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese
SFB	<i>segmented filamentous bacterium</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	Tris-Acetat-ETDA
TE	Tris-EDTA
TAM	Tamoxifen
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>Transforming growth factor β</i>
T _H -Zellen	T-Helferzelle
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TM	Transmembran
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Trp	Tryptophan
TSA	<i>tyramide signal amplification</i>
Tyk	<i>tyrosine kinase</i>
U	Umdrehung
UPL	<i>Universal probe library</i>
Vil	Villin

v/v	Volumen/Volumen
v/w	Gewichtsprozent
Wnt	<i>Wingless (WNT), wingless type MMTV integration site</i>
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter
μ m	Mikrometer

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Rezeptorkomplexbildung der Interleukin 6 Zytokinfamilie	1
Abbildung 1.2: Struktureller Aufbau von gp130	5
Abbildung 1.3: Der IL-6 Signalweg	7
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung von gp130 und Lgp130	9
Abbildung 1.5: Expressionskassette von Lgp130	9
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des Leberaufbaus	12
Abbildung 1.7: Der Colonquerschnitt	16
Abbildung 1.8: Struktur und zelluläre Zusammensetzung der Krypten	18
Abbildung 3.1 Primerbindung an ROSA26-WT-Lokus und ROSA26-Lokus mit inserierter Lgp130 Kassette	28
Abbildung 4.1: Zellautonome gp130 Aktivierung in Hepatozyten	46
Abbildung 4.2: Zellautonome Genregulation nach gp130 Aktivierung in Hepatozyten	48
Abbildung 4.3: gp130/STAT3 Signalweg induziert Akut-Phase Gen Expression	50
Abbildung 4.4: Rekrutierung von myeloiden Zellen durch Hepatozyten-spezifische gp130 Aktivierung	52
Abbildung 4.5: Keine Induktion von Leberzelltumoren bei anhaltender Hepatozyten-spezifischer Lgp130 Aktivierung	53
Abbildung 4.6: Anhaltende Hepatozyten-spezifische Lgp130 Aktivierung führt zu einer systemischen Amyloidose	54
Abbildung 4.7: Erhöhte Anzahl von myeloiden Zellen bei gealterten Mäusen mit Hepatozyten-spezifischer Lgp130-Aktivierung	55
Abbildung 4.8: Keine morphologische Veränderung im Colon durch Lgp130 Aktivierung in Hepatozyten	56
Abbildung 4.9: Hepatozyten-spezifische gp130 Aktivierung führt zu erhöhten IL-6 und IL-23 Spiegeln im Colon	57
Abbildung 4.10: Alb-CreERT ² ::ROSA ^{Lgp130/Lgp130} Mäuse zeigen geringeren Schweregrad bei DSS-Kolitis trotz vermehrtem Gewichtsverlust	59
Abbildung 4.11: Erhöhte SAA1/2 Serumspiegel führen nicht zu einer akut vermehrten SAA Ablagerung im Colon	60
Abbildung 4.12: Verminderte Zytokinexpression im Colon von Mäusen mit DSS-Kolitis	61
Abbildung 4.13: Vermehrte Tumorinduktion bei Alb-CreERT ² ::ROSA ^{Lgp130/Lgp130} Mäusen nach einer AOM/DSS-Kolitis	62
Abbildung 4.14: Verringerte Hyperplasie bei Lgp130 induzierten Mäusen nach einer AOM/DSS-Kolitis	63

Abbildung 4.15: Erhöhte SAA1/2 Serumspiegel und vermehrte Ablagerungen im Colon nach einer AOM/DSS-Kolitis	64
Abbildung 4.16: Signifikant erhöhte IL-1 β und IL-23 Spiegel im Colon nach einer AOM/DSS-Kolitis	65
Abbildung 4.17: Vil-CreERT ² ::ROSA ^{Lgp130/Lgp130} Mäuse zeigen nach Induktion leicht veränderte Darmmorphologie	66
Abbildung 4.18: Lgp130 Expression in intestinalen Epithelzellen führt zu erhöhten <i>Saa1</i> und <i>Saa2</i> Transkripten im Colon	66
Abbildung 4.19: Vil-CreERT ² ::ROSA ^{Lgp130/Lgp130} Mäuse zeigen geringeren Schweregrad bei DSS-Kolitis trotz vermehrtem Gewichtsverlust	68
Abbildung 4.20: Vermehrte SAA1/2 Ablagerungen im Colon bei Vil-CreERT ² ::ROSA ^{Lgp130/Lgp130} Mäusen nach DSS-Kolitis	69
Abbildung 4.21: Vermehrte Tumorinduktion bei Vil-CreERT ² ::ROSA ^{Lgp130/Lgp130} Mäusen nach einer AOM/DSS-Kolitis	70
Abbildung 4.22: Leichte Hyperplasie in Mäusen mit intestinaler Lgp130 Expression in einem chemisch induzierten Colon-Karzinom-Modell	71
Abbildung 4.23: Lgp130 Expression in Darmepithelzellen führt zu signifikant erhöhten <i>Saa1</i> und leicht erhöhten <i>Saa2</i> Expression nach einer AOM/DSS-Kolitis	72
Abbildung 5.1: Konstitutiv aktive gp130 Aktivierung in Hepatozyten löst Aktivierung der Akut-Phase-Reaktion und der robusten angeborenen Immunantwort aus	82
Abbildung 5.2: Konstitutiv aktive gp130 Aktivierung in intestinalen Epithelzellen führt zu lokalen Entzündungsreaktionen im Darm	85
Abbildung 5.3: Konstitutiv aktive gp130 Aktivierung wirkt schützend auf das Darmepithel bei einer DSS-Kolitis	89
Abbildung 5.4: Konstitutiv aktive gp130 Aktivierung führt zur vermehrten Tumorinduktion	94

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Chemikalien	24
Tabelle 3.2: Primer für genomische DNA	24
Tabelle 3.3: Primer für quantitative Real-Timer PCR unter Verwendung des <i>Roche Universal Probe Library (UPL)</i> Systems	25
Tabelle 3.4: Primäre Antikörper für Immuno-Blotting	25
Tabelle 3.5: Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz von Cryoschnitten	26
Tabelle 3.6: Sekundäre Antikörper	26
Tabelle 3.7: Mauslinien	27
Tabelle 3.8: Konditionen für Vil-CreERT ² ::ROSA ^{Lgp130/Lgp130} PCR	29
Tabelle 3.9: Konditionen für Alb-CreERT ² ::ROSA ^{Lgp130/Lgp130} PCR	30
Tabelle 3.10: Konditionen für R26 ^{Lgp130/Lg130} PCR	31

7.4 Curriculum vitae

Name: Monja Gandraß
Geburtsdatum: 15. Dezember 1991
Geburtsort: Hamburg

Ausbildung

2018 – 2023 PhD Student
Institut für Biochemie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

2018 Masterarbeit
Institut für Tumorbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)

2016 – 2018 Biologie, Master of Science
Universität Hamburg

2016 Bachelorarbeit
Institut für Ökologie und biologische Ressourcen, Universität Hamburg

2013 - 2016 Biologie, Bachelor of Science
Universität Hamburg

2012 - 2013 Geschichte, Bachelor of Arts (ohne Abschluss) Universität Hamburg

2002 - 2012 Abitur
Gymnasium Harksheide, Norderstedt

1998 - 2002 Grundschule Falkenberg, Norderstedt

Posterpräsentationen

35. Annual Conference of the German Association of the Study of the Liver, Heidelberg, Deutschland (2019)

Gastsprechersymposium „Leberentzündungen – Infektion, Immunregulation und Konsequenzen“, Hamburg, Deutschland (2019)

IRTG Summer School on “Degradomics - Protease Web in Health and Disease”, Kiel, Deutschland (2019)

Publikationen

Bolik J., Krause F., Stevanovic M., Gandraß M., Thomsen I., Schacht S., Rieser E., Müller M., Schumacher N, Fritsch J., Wichert R, Galun E, Bergmann J, Röder C, Schafmayer C, Egberts J-H, Becker-Pauly C, Saftig P, Lucius R., Schneider-Brachert W, Barikbin R, Adam D, Voss M., Krüger A, Strilic B, Sagi I, Walczak H Rose-John S and Schmidt-Arras D. Inhibition of ADAM17 impairs endothelial cell necroptosis and blocks metastasis. *J Exp Med.* 2022 Jan 3;219(1):e20201039.

Schumacher N*, Yan K*, Gandraß M*, Müller M*, Krisp C, Häslер R, Carambia A, Nofer JR, Bernardes JP, Khouja M, Thomsen I, Chalupsky K, Bolik J, Hölscher C, Wunderlich T, Herkel J, Rosenstiel P, Schramm C, Schlüter H, Renné T, Mittrücker HW, Rose-John S, Schmidt-Arras D. Cell-autonomous hepatocyte-specific GP130 signaling is sufficient to trigger a robust innate immune response in mice. *J Hepatol.* 2021 Feb;74(2):407-418.

7.5 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Dirk für die Betreuung dieser Promotion herzlich bedanken. Danke für die Unterstützung und die konstruktiven Diskussionen. Du hast mich ermutigt, über mich hinauszuwachsen.

Ich bin Stefan Rose-John sehr dankbar, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in seinem Institut zu arbeiten. Ich bedanke mich ausdrücklich für die fachliche Unterstützung, die konstruktiven Diskussionen und Ratschläge.

Ein herzliches Dankeschön an Thomas Roeder für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ich möchte mich beim SFB841 für die Finanzierung des Projekts bedanken. Mein Dank gilt auch dem GRK des SFB841 und dem IRTG des SFB877 für die Möglichkeit, meine Soft Skills zu verbessern.

Ein großes Dankeschön an alle ehemaligen und aktuellen Mitglieder des Instituts, insbesondere an Petra für die Hilfe bei allen administrativen Hürden.

Ein besonderer Dank geht an Julia und Neele für die vielen Ratschläge und Hilfestellungen und dafür, dass sie sich so oft Zeit genommen haben, um mir fachlich weiter zu helfen. Ohne euch hätte ich einen schweren Start gehabt.

Ich möchte mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitglieder der AG Schmidt-Attas (in keiner besonderen Reihenfolge: Julia, Fabian, Pit, Elias, Freia, Sarah, Ilka, Mouhamad, Luise, Niklas, Theo) für die guten Zeiten, Unterhaltungen, Ermutigungen und Unterstützung in und außerhalb des Labors bedanken.

Schließlich möchte ich mich herzlich bei meiner Familie und Freunden bedanken, die immer hinter mir standen und an mich geglaubt haben.