

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK UND POLIKLINIK II  
GROßHADERN DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORSTAND: PROF. DR. MED. B. GÖKE

**Das gp130-Zytokin Novel Neurotrophin-1/B Cell Stimulating  
Factor-3 stimuliert die POMC-Genexpression und ACTH-  
Sekretion der kortikotrophen Zellen über einen Jak (Janus  
Kinase)- und STAT (Signal Transducer and Activator of  
Transcription)- abhängigen Mechanismus**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Nicola Berrit Isele  
aus Mannheim

**2004**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. D. Engelhardt  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. F. Holsboer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. R. Gärtner  
Prof. Dr. med. W. Müller-Felber

Betreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. C. Auernhammer

Dekan: Prof. Dr.med. Dr.h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2004

Für meine Eltern

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S. 1
1.1 Interleukin-6-Zytokinfamilie	S. 1
1.2 Jak-STAT-Signalkaskade	S. 3
1.3 Inhibitoren der Jak-STAT-Signalkaskade	S. 4
1.4 NNT-1/BSF-3 – ein neues gp130-Zytokin	S. 7
1.5 Regulation der kortikotrophen Zellfunktion durch die Jak-STAT-Signalkaskade	S. 9
2. Materialien und Methoden	S. 11
2.1 Materialien	S. 11
2.1.1 Zellkultur	S. 11
2.1.2 Stimulationsversuche	S. 11
2.1.3 Northern Blot	S. 12
2.1.4 Luciferaseassay	S. 13
2.1.5 PCR und Vektorvermehrung	S. 13
2.1.6 Western Blot	S. 14
2.1.7 ACTH-Radioimmunassay	S. 14
2.2 Methoden	S. 15
2.2.1 Zelllinien und Zellkultur	S. 15
2.2.2 Northern Blot Analyse	S. 15
2.2.3 Proteinextraktion und Western Blot Analyse	S. 17
2.2.4 Luciferaseassay	S. 18

2.2.5 RT-PCR und Sequenzierung	S. 18
2.2.6 ACTH-Radioimmunassay	S. 19
2.2.7 Statistik	S. 20
3. Ergebnisse	S. 21
3.1 Expression des funktionellen CNTF-Rezeptors in AtT20-Zellen und murinen Hypophysen	S. 21
3.2 NNT-1/BSF-3 aktiviert die Jak-STAT-Kaskade in AtT20-Zellen	S. 22
3.2.1 STAT-Phosphorylierung	S. 22
3.2.2 SOCS-3-Genexpression	S. 24
3.3 NNT-1/BSF-3 induziert die Expression von POMC und die ACTH-Sekretion	S. 26
3.3.1 Expression von POMC	S. 26
3.3.2 Stimulierung der ACTH-Sekretion	S. 28
3.4 Effekte von NNT-1/BSF-3 in SOCS3 überexprimierenden AtT20- Zellen	S. 29
3.4.1 Hemmung der STAT-Phosphorylierung	S. 29
3.4.2 Effekte auf STAT-abhängigen Promotoraktivitäten	S. 30
3.4.3 Inhibition der endogenen SOCS3-Genexpression in den SOCS3-überexprimierenden Zellen	S. 32
3.4.4 Wirkungen auf die ACTH-Sekretion	S. 33
3.5 Effekte von NNT1/BSF-3 in STAT3 dominant negativ mutierten AtT20-Zellen	S. 34
3.5.1 STAT3-Phosphorylierung	S. 34

3.5.2 Wirkungen auf STAT-abhängige Promotoraktivitäten	S. 36
4. Diskussion	S. 38
5. Zusammenfassung	S. 44
6. Literaturverzeichnis	S. 45
7. Danksagung	S. 63
8. Lebenslauf	S. 65

# 1. Einleitung

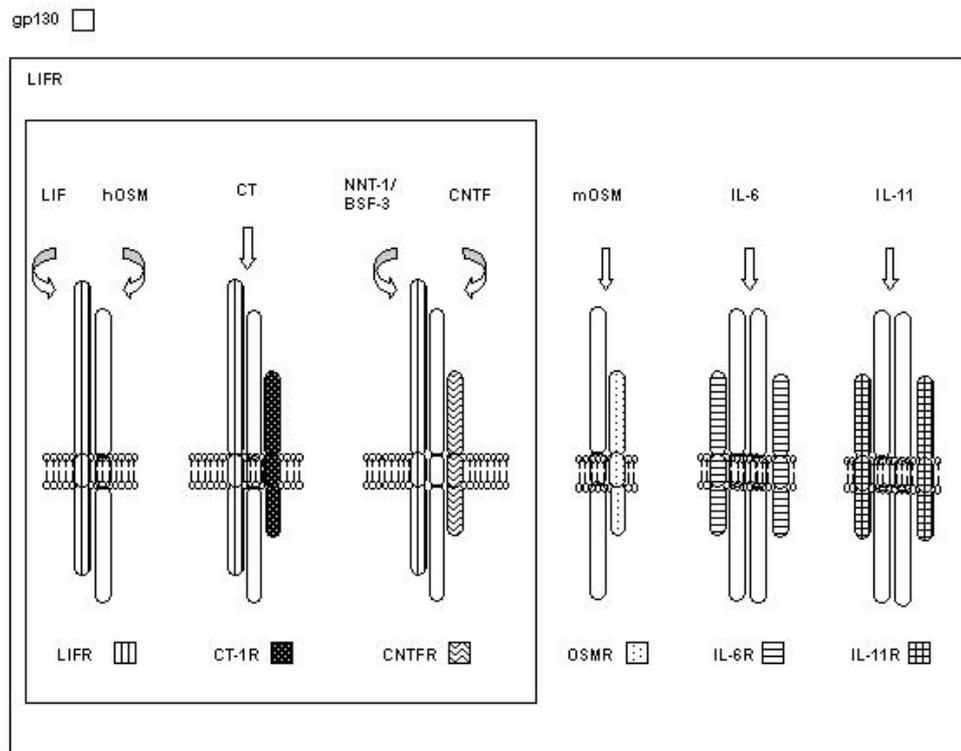
## 1.1 IL-6-Zytokinfamilie

Zytokine spielen eine wichtige Rolle in unserem Organismus. Diese sind multifunktionelle Proteine, die von verschiedenen Zelltypen sezerniert werden. Sie beeinflussen unterschiedliche Zielzellen und modellieren bei diesen jeweils zellspezifische Funktionen. Zytokine wirken häufig sowohl lokal autokrin und parakrin als auch systemisch.

Zytokine werden zu verschiedenen Familien zusammengefasst. Die Einteilung erfolgt anhand struktureller Ähnlichkeiten, gleicher oder ähnlicher Funktionen im Zielgewebe sowie anhand gemeinsamer Rezeptoruntereinheiten und Signalkaskaden.

So werden die Zytokine Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-11 (IL-11), Leukemia inhibitory Factor (LIF), Oncostatin M (OSM), Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), Cardiotrophin-1 (CT-1) und Novel Neurotrophin-1/B-cell-stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3) zur IL-6-Familie zusammengefasst (34, 37, 86, 66, 62). Diese Zytokinfamilie ist eine Untergruppe der Klasse-I-Zytokin-Rezeptor-Familie (37, 11, 12, 85). Deren Rezeptoren zeichnen sich durch eine sequentielle und strukturelle Ähnlichkeit ihrer extrazellulären Regionen aus, welche die Zytokin-Bindungsdomäne beinhalten. Weiterhin bestehen diese Rezeptoren aus einer einzelnen transmembranären Region und einer intrazellulären Domäne unterschiedlicher Länge, die aber keine endogene Kinaseaktivität besitzt. Die Mitglieder der Klasse-I-Zytokin-Rezeptor-Familie bilden Komplexe aus verschiedenen Untereinheiten. Durch Ligandenbindung wird die Bildung eines homodimeren Rezeptorkomplexes (GHR, PRLR, EpoR, G-CSFR) oder eines heterodimeren Rezeptorkomplexes aus der Zytokin spezifischen  $\alpha$ -Rezeptoruntereinheit und einer weiteren Untereinheit gebildet. Zu der letztgenannte Gruppe gehören unter anderem Zytokine deren Rezeptor zusätzlich

eine  $\beta$ -Kette (zum Beispiel IL-3R, IL-5R und GM-CSFR), eine  $\gamma$ -Kette (zum Beispiel IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-15R) oder die gemeinsame Glykoprotein (gp) 130-Rezeptoruntereinheit (IL-6R, IL-11R, LIFR, OSMR, CNTFR, CT-1R) aufweisen (78, 42, 91). Diese gp130-Zytokinfamilie wird auch als IL-6-Zytokinfamilie bezeichnet.



**Abb. 1. Die Rezeptoren der gp130-Zytokine gehören zu der Klasse-I-Zytokin-Rezeptorfamilie.**  
Die Rezeptoren der IL6-Familie bestehen aus einer gemeinsamen Rezeptoruntereinheit Glykoprotein (gp) 130 und jeweils spezifischen Rezeptoruntereinheiten.

Bindet IL-6 an die Rezeptoruntereinheit IL-6R, assoziiert dieser Komplex mit gp130 und diese homodimerisiert. IL-6 bildet mit seinem Rezeptor ein Hexamer (IL-6/IL-6R/gp130) in einer 2:2:2-Konformation (55, 64, 52, 77, 16). Ein ähnliches Modell wurde für IL-11 postuliert (21, 10). Die Rezeptoruntereinheiten IL-6R und IL-11R müssen nicht in einer membrangebundenen Form vorliegen, da lösliche Formen dieser Untereinheiten (sIL-6R und sIL-11R) sowohl an die Liganden als auch an gp130 binden und auf diese Weise ihre Wirkungen zeigen. Bindet LIF oder OSM an die Rezeptoruntereinheit LIFR, so bildet diese mit gp130 ein Heterodimer (40, 33). Weiterhin kann OSM an seine Rezeptoruntereinheit OSMR

binden, welche einen funktionellen Komplex mit gp130 bildet. Hingegen induziert die Bindung von CNTF an seinen Rezeptor CNTFR die Formation eines Komplexes aus gp130, LIFR und CNTFR (25, 80, 49, 63, 27, 2). Die lösliche Rezeptoruntereinheit CNTFR (sCNTFR) ist fähig, CNTF zu binden, und induziert auf diese Weise die Bildung eines gp130/LIFR-Heterodimers (24). CT-1 bindet ebenfalls an den heterodimeren LIFR/gp130-Rezeptorkomplex. Desweiteren wird eine CT-1 $\alpha$ -Rezeptoruntereinheit postuliert (65, 69).

Durch das Vorhandensein der gemeinsamen Rezeptoruntereinheit gp130 in den jeweiligen Rezeptorkomplexen lassen sich die teilweise überlappenden biologischen Wirkungen der Mitglieder der IL-6-Familie erklären. Hierzu gehören unter anderem die Induktion der Sekretion von ACTH (Adrenocorticotrophes Hormon), die Bildung hepatischer Akute-Phase-Proteine und die neuronale Differenzierung (87, 59). Die für das Zytokin spezifischen Effekte auf die unterschiedlichen Zielzellen werden hingegen durch die für das jeweilige Zytokin spezifischen Rezeptoruntereinheiten vermittelt.

### *1.2 Jak-STAT-Signalkaskade*

Die Mitglieder der gp130-Familie aktivieren die Jak-STAT-Signalkaskade. Die Janus-Kinasen (Jak) JAK1, JAK2 und TYK2 befinden sich im Zytoplasma der Zellen und sind an den gp130-Rezeptorkomplex assoziiert (41, 22). Bindet der Ligand an den Rezeptor, wird die Homo- beziehungsweise Heterodimerisierung des Rezeptorkomplexes ausgelöst. Dadurch wird die Autophosphorylierung der Janus-Kinase induziert, wodurch diese aktiviert wird. Dies wiederum hat eine Phosphorylierung von Tyrosinresten der zytoplasmatischen Rezeptordomänen und der STAT-Proteine (Signal-Transducers-and-Activators-of-Transcription) zur Folge.

Inzwischen sind vier verschiedene Mitglieder der Jak-Familie beschrieben worden, Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2 (42, 19, 54). Diese Janus-Kinasen besitzen eine strukturelle Homologie (42, 19, 54).

Durch die gp130-Zytokine wird die Tyrosinphosphorylierung von STAT3, STAT1 und zum Teil auch STAT5 induziert. Die Phosphorylierung von Tyrosinresten der STAT3- und STAT1-Proteine induziert die Bildung von Homodimeren und Heterodimeren der STAT-Proteine. Die Proteine binden sich gegenseitig an ihren SH2-Domänen, so dass STAT3-STAT3-, STAT1-STAT3- oder STAT1-STAT1-Dimere entstehen (23, 39). Diese Dimere translozieren in den Zellkern. Dort binden sie als Transkriptionsfaktoren an spezifische STAT-Bindungs-Elemente in den Promotorregionen verschiedener Gene, wodurch deren Expression aktiviert wird (44, 23, 39).

Zur Zeit sind sechs STAT-Proteine bekannt, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 $\alpha$ , STAT 5 $\beta$  und STAT6 (23, 39). Während STAT1, STAT3 und STAT5 durch viele Zytokine stimuliert werden, sind STAT2, STAT4 und STAT6 selten in Signalkaskaden involviert (42, 46, 59). Die Aktivierung der verschiedenen STAT-Proteine durch die unterschiedlichen Zytokine wird auf die strukturellen Unterschiede der STAT-Bindungsdomäne der verschiedenen Rezeptoren und der SH2-Domäne der STAT-Proteine zurückgeführt.

### *1.3 Inhibitoren der Jak-STAT-Signalkaskade*

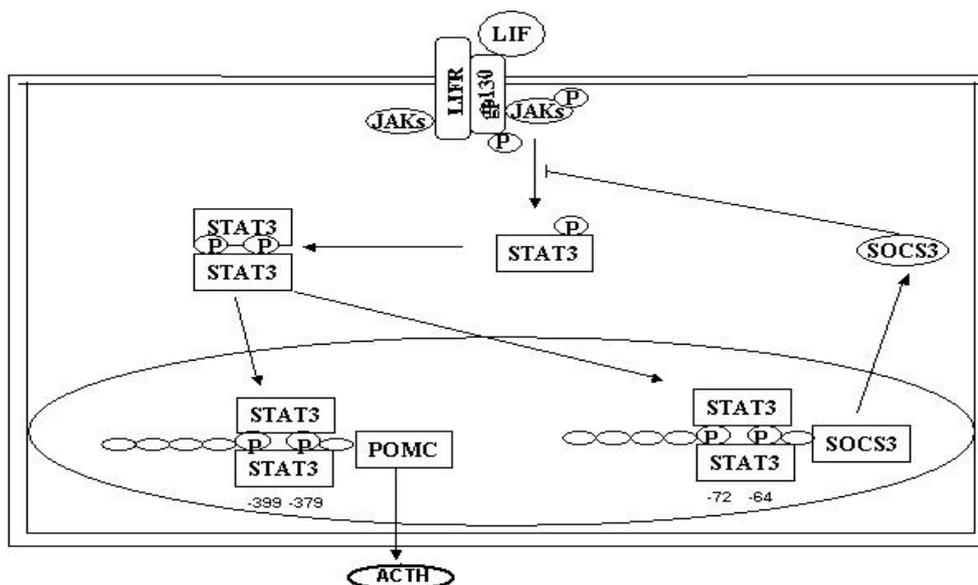
Es sind eine Reihe von intrazellulären Inhibitoren bekannt, die die Aktivierung der Jak-STAT-Kaskade limitieren. Zu ihnen gehören unter anderem SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling), PIAS (Protein Inhibitors of Activated STAT) sowie SHP2 (SH2-containing Protein Tyrosin Phosphatase).

SOCS-1 und SOCS-3 hemmen die Jak-Aktivität, wodurch die Tyrosinphosphorylierung der STAT-Proteine und damit deren Aktivierung

verhindert wird. Die SOCS-Familie umfasst acht strukturähnliche Proteine, die als CIS/CIS1 (93, 48), SOCS1/JAB/SSI1 (30, 57, 81), SOCS2/CIS2/SSI2 (48, 53, 81), SOCS3/CIS3/SSI3 (48, 53, 81) und SOCS4 bis SOCS7 (38) bezeichnet werden. Die alternativ verwendeten Bezeichnungen stehen für: CIS: Cytokine-Inducible SH2 containing protein, SSI: STAT-induced STAT Inhibitors und JAB: Jak Binding Protein. Sie weisen alle die zentrale SH2 (Scr-Homologie)-Domäne und die C-terminale SOCS-Box auf.

SOCS-Proteine inhibieren die Jak-STAT-Kaskade durch verschiedene Mechanismen. Erstens können SOCS1 und SOCS3 direkt an Jak2 binden, wodurch die Kinaseaktivität inhibiert wird (30, 48, 62, 83, 60, 92). Für die Bindung der SOCS-Proteine an die Janus-Kinase ist die SH2-Domäne und eine N-terminale Region, die als „Kinase Inhibitory Region“ (KIR) bezeichnet wird, von SOCS1 und SOCS3 notwendig (92, 71, 72). Der phosphorylierte Tyrosinrest Tyr<sup>1007</sup> der JH1-Kinaseregion von Jak2 wird von der zentralen SH2-Domäne der SOCS1- (92) und der SOCS3-Proteine (71) gebunden. Es wurde gezeigt, dass SOCS1 ebenfalls die Aktivität von Jak1, Jak3 und Tyk2 inhibiert. Zweitens binden SOCS3 und CIS mittels ihrer zentralen SH2-Domäne an phosphorylierte Tyrosinreste in aktivierten intrazellulären Zytokinrezeptorregionen. Auf diese Weise interferieren sie mit der Anlagerung weiterer Proteine, z.B. STATs und SHP-2, an die intrazelluläre Zytokinrezeptorregion, wodurch deren Aktivierung möglicherweise unterdrückt wird. Es ist gezeigt worden, dass SOCS3 direkt an den Tyrosinrest Tyr<sup>757</sup> der murinen gp130-Rezeptoruntereinheit bindet (61). SOCS3 und die Proteintyrosinphosphatase SHP-2 lagern sich an den gleichen Phosphotyrosinrest der gp130-Untereinheit an. Ihre SH2-Domänen weisen ähnliche Bindungsspezifitäten bezüglich diesem Phosphotyrosinrest auf (26). Sie konkurrieren somit um die gleiche Bindungsstelle. Jedoch sind ihre hemmenden Effekte auf die Jak-STAT-Kaskade unabhängig voneinander. Drittens wird das SOCS-Boxmotiv von Elongin C und B gebunden. Die Bindung des Elongin BC-Komplexes an SOCS führt zur Bildung eines E3-Ubiquitin-Protein-Ligase-Komplex. Dies wiederum löst eine Ubiquitinierung sowohl spezifischer Substrate,

die an SOCS gebunden sind, als auch des SOCS-Proteins selbst aus. Die Polyubiquitinierung führt diese Proteine der Degradation durch das 26S Proteasom zu (43). Proteasom-Inhibitoren hemmen die spezifische Proteolyse der Zielsubstrate, wie zum Beispiel des Jak2-SOCS1-Komplexes oder des gp130-SOCS-Komplexes (31, 89). Durch diese Mechanismen hemmen SOCS1 und SOCS3 die Signalkaskaden verschiedener Jak-STAT-abhängiger Zytokine, wie IL-6 (57, 81), LIF (48, 53, 57, 81, 3, 92), OSM (81), IL-11 (4), IL-2 (30), IL-3 (30), Epo (30, 92), GH (1), PRL (35), Leptin (14) und IFNs (81, 70, 79) . Die Expression der SOCS-Proteine wird durch verschiedene Zytokine und auf eine zellspezifische Weise stimuliert (30, 57, 81, 1, 3, 5, 14, 70, 35). Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass SOCS1 und SOCS3 einen hemmenden Effekt auf ihre eigene STAT-abhängige Expression aufweisen. Auf diese Weise wird ihre intrazelluläre Akkumulation verhindert (57, 5). Die Zytokin-induzierte SOCS1- und SOCS3-Genexpression ist von STAT3 abhängig (57, 5), während beide Proteine wiederum die STAT3-Phosphorylierung inhibieren. Die SOCS3-Promotorregion weist ein STAT1/STAT3-Bindungsselement auf, das für diese Mechanismen verantwortlich ist (5).



**Abb. 2. Die gp130-Zytokine aktivieren die Jak-STAT-Kaskade.**

LIF, ein gp130-Zytokin, aktiviert durch seine Bindung an den Rezeptor die Janus-Kinase (Jak). Diese phosphoryliert zum einerseits sich selber, die Rezeptoruntereinheiten und andererseits die STAT-Proteine. Phosphorylierte STAT-Proteine bilden Dimere, die in den Nucleus translozieren. Dort binden sie an STAT-Bindungsselemente der DNS, wodurch die Expression verschiedener Gene induziert wird. Zum einem wird die POMC-Expression aktiviert, die dann zur ACTH-Sekretion führt. Zum anderen wird SOCS3 vermehrt exprimiert, welches einen hemmenden Effekt auf die Jak-STAT-Kaskade aufweist.

Im Gegensatz dazu interagieren PIAS1 und PIAS3 direkt mit aktiviertem STAT1 und STAT3. PIAS-Proteine inhibieren die DNS-Bindung der STAT-Homo- bzw. Heterodimere (20, 46).

Ein weiterer intrazellulärer Inhibitor der Jak-STAT-Kaskade ist die Tyrosinphosphatase SHP2. Zytokinbindung an den gp130-Rezeptorkomplex induziert die Anlagerung von SHP2 an gp130 (82). Dadurch wird die Tyrosinphosphorylierung von SHP2 ausgelöst (50, 82). Bei der Überexpression einer dominant negativen Mutante von SHP2 (84, 75) ebenso wie bei einer mutierten gp130-Rezeptoruntereinheit, bei der die Bindungsstelle für SHP2 fehlt (83), zeigt sich in verschiedenen Zellmodellen eine Erhöhung der von CNTF vermittelten Bindung von STAT-Dimeren an die DNS.

Einige Mitglieder der IL-6-Familie aktivieren die Ras-MAPK-Kaskade. So wird die Aktivierung der Mitogen-Activated-Protein-Kinase (MAPK) über gp130 und LIFR vermittelt, wobei SHP2 essentiell ist (73). Im Gegensatz zu ihrem hemmenden Effekt auf die gp130-vermittelte STAT-Aktivierung ist SHP2 somit für die gp130-induzierte Aktivierung von MAPK wichtig.

Die beiden Signalkaskaden Jak-STAT und Ras-MAPK beeinflussen sich gegenseitig. MAPK induziert unter anderem die Serinphosphorylierung von STAT3, deren Bedeutung für die Signalinduktion jedoch umstritten ist.

#### *1.4 NNT-1/BSF-3 – ein neues gp130 Zytokin*

Ein neues Zytokin der gp130-Familie wurde 1999 von Senaldi et al. kloniert und erhielt den Namen Novel Neurotrophin-1/B-cell Stimulating Factor-3 (NNT-1/BSF-3) (GenBank Accession AF 176912) (74). Unabhängig davon wurde das gleiche Zytokin von Shi et al. beschrieben und aufgrund seiner Homologie zu

Cardiotrophin (CT)-1 als Cardiotrophin-Like-Cytokine (CLC) bezeichnet (GenBank Accession AF172854) (76).

NNT-1/BSF-3 ist ein pleiotropes Zytokin mit verschiedenen Effekten. Es fördert *in vitro* das Überleben von embryonalen Sympathikusneuronen (74), Motoneuronen (74, 68) und Neuroblastenzelllinien (68). Ferner induziert es die Differenzierung fetaler neuroepithelialer Zellen zu Astrozyten (88). Diese Befunde weisen darauf hin, dass NNT-1/BSF-3 eine wichtige Rolle für die neuronale Entwicklung spielt. Jedoch sind Daten zu NNT-1/BSF-3 Knockout-Mäusen bisher nicht veröffentlicht. Weiterhin stellt NNT-1/BSF-3 einen potenten B-Zell-stimulierenden Faktor dar. Durch die *in vivo* Applikation von NNT-1/BSF-3 in Mäusen kommt es zur folliculären Hyperplasie der sekundären lymphatischen Organe, Vermehrung der B-Zellen sowie zum Anstieg der Serumspiegel von IgG und IgM (74). Ebenso induziert NNT-1/BSF-3 das Wachstum der murinen myeloischen Leukämie-Zelllinie M1, die Bildung des Akuten-Phase-Proteins SAA (Serum-Amyloid-A) sowie die Stimulierung der Kortisonsekretion bei Mäusen (74).

NNT-1/BSF-3 kann nicht als einzelnes Peptid sezerniert werden. Es bildet entweder mit dem löslichen Rezeptor Cytokine-Like-Factor-1 (CLF-1), welcher eine Homologie zu den Mitgliedern der Cytokine-Type-1-Familie aufweist (28), einen stabilen CLF/NNT-1/BSF-3-Komplex (68) oder mit sCNTFR einen NNT-1/BSF-3/sCNTFR-Komplex (68). Diese Komplexbildungen sind für die Sekretion, nicht aber für die Bindung an die Zelloberfläche nötig. Die Bindung erfolgt über den funktionellen CNTF-Rezeptor, bestehend aus gp130, LIFR und CNTFR $\alpha$  (24). In der Neuroblastom Zelllinie SK-N-MC (gp130+, LIFR+, CNTFR $\alpha$ +) stimulieren NNT-1/BSF-3 und NNT-1/BSF-3/CLF die Tyrosin-phosphorylierung von Jak1 (45), Jak2 (45), Tyk2 (45), gp130 (74, 76, 29, 45) LIFR (74, 29, 45), STAT1 (76, 45) und STAT3 (74, 29, 68, 45) sowie die MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 (45) und den PI3-Kinase Pathway (45). Hingegen zeigt sich keine Stimulation der Tyrosinphosphorylierung von STAT2, STAT4, STAT5 und STAT6 (45). Im Gegensatz hierzu aktiviert NNT-1/BSF-3/CLF in der Leberzelllinie HepG2

(gp130+, LIFR+ und CNTFR $\alpha$ -) nicht die STAT3-Phosphorylierung. Transfiziert man dagegen die HepG2-Zellen mit CNTFR $\alpha$ , stimuliert NNT-1/BSF-3/CLF die STAT3-Phosphorylierung (29). Dieser Effekt zeigt sich auch bei der Inkubation der Zellen mit NNT-1/BSF-3-sCNTFR $\alpha$ -Komplexen (68). Weitere Daten zeigen, dass die CNTFR $\alpha$ -Untereinheit essentiell für die NNT-1/BSF-3/CLF-Bindung ist (45).

### *1.5 Regulation der kortikotrophen Zellfunktion durch die Jak-STAT-Signalkaskade*

Die Hypophysenfunktion wird klassischerweise von hypothalamischen Releasing-Hormonen reguliert. Zusätzlich stellen unter anderem die Zytokine der gp130-Familie wichtige neuroimmunoendokrine Modulatoren der Hypophysenfunktion dar (51, 13, 4). Diese Zytokine aktivieren die Jak-STAT-Kaskade. Da die POMC-Promotor-Region eine STAT-bindende Sequenz aufweist (56), wird über diese Kaskade die POMC-Gen-Expression induziert und damit auch die ACTH-Sekretion ausgelöst. ACTH wiederum stimuliert die Ausschüttung von Glukokortikoiden in der Nebennierenrinde.

Das Ziel der hier vorgelegten Studie war die Untersuchung der Wirkung von NNT-1/BSF-3 auf die kortikotrophen Zellen am Modell der murinen Zelllinie AtT20 in vitro. Wir konnten nachweisen, dass rekombinantes, humanes NNT-1/BSF-3 die STAT-Phosphorylierung induziert. Dadurch wird die STAT-abhängige POMC-Gen-Expression und nachfolgend die Sekretion von ACTH aktiviert. Ferner beobachteten wir eine Stimulation der STAT-abhängigen SOCS3-Genexpression. Es zeigte sich ein hemmender Effekt von SOCS3 auf die durch NNT-1/BSF-3 induzierte Phosphorylierung von STAT, STAT-abhängige Genexpression von POMC sowie ACTH-Sekretion. Die Bedeutung der STAT3-Proteine für die

Signalinduktion konnten wir anhand STAT3-dominant negativer Mutanten zeigen. Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass NNT-1/BSF-3 ein potenter Stimulator der kortikotrophen Zellfunktion ist. Dies geschieht über die Jak-STAT-Signalkaskade, die einer durch SOCS3 vermittelten negativen Rückkopplung unterliegt.

## **2. Materialien und Methoden**

### *2.1 Materialien*

#### *2.1.1 Zellkultur*

Zellkultur Brutschrank, Heraeus Instruments (Osterode, BRD)

Zellkulturflaschen, Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, BRD)

Zellkulturplatten, Falcon (Heidelberg, BRD)

AtT-20/D16v-F2 Zellen, ATCC (Manassas, VA)

Amphotericin B, Biochrom AG (Berlin, BRD)

Penicillin-Streptomycin, Gibco BRL (Paisley, Scotland)

Glutamin, Biochrom AG (Berlin, BRD)

DMEM, PAA Laboratories (Cölbe, BRD)

FKS, Biochrom AG (Berlin, BRD)

BSA, Sigma (Deisenhofen, BRD)

G418, PAA Laboratories (Cölbe, BRD)

Trypsin, Biochrom AG (Berlin, BRD)

#### *2.1.2 Stimulationsversuche*

NNT-1/BSF-3, Amgen Inc. (Thousand Oaks, Ca, USA)

Rekombinantes, humanes CNTF, R&D Systems (Wiesbaden, BRD)

Rekombinantes, murines LIF, R&D Systems (Wiesbaden, BRD)

Natriumzitrat, Sigma (Deisenhofen, BRD)

### 2.1.3 Northern Blot

Agarose, peQLab (Erlangen, BRD)  
Bromphenolblau, Sigma (Deisenhofen, BRD)  
Chloroform, Merck (Darmstadt, BRD)  
Trizol, Invitrogen (Karlsruhe, BRD)  
DMSO, Merck (Darmstadt, BRD)  
Isopropylalkohol, Sigma (Deisenhofen, BRD)  
Ethanol, Merck (Darmstadt, BRD)  
Diethyl-Pyrocyanat, Sigma (Deisenhofen, BRD)  
Morpholinopropansulfonsäure, Merck (Darmstadt, BRD)  
Formaldehyd, Sigma (Deisenhofen, BRD)  
Deionized Formamide, Gibco BRL (Paisley, Scotland)  
Ethidium Bromide, Sigma (Deisenhofen, BRD)  
TRIS, Roth (Karlsruhe, BRD)  
Hybond-N+-Membran, Amersham (Freiburg, Deutschland)  
Whatman 3MM CHR, Whatman International (Maidstone, England)  
Xylen Cyanol, Sigma (Deisenhofen, BRD)  
DNS Polymerase, Perkin-Elmer (Foster City, Ca, USA).  
Natriumchlorid, Sigma (Deisenhofen, BRD)  
NaOH-Pellets, Sigma (Deisenhofen, BRD)  
Natriumacetat, Sigma (Deisenhofen, BRD)  
Titriplex III, Merck (Darmstadt, BRD)  
Natriumzitrat, Sigma (Deisenhofen, BRD)  
Biomax MS, Eastman Kodak (Rochester, NY, USA)  
Tween20, Merck (Darmstadt, BRD)  
Natriumdodecylsulfat, Sigma (Deisenhofen, BRD)  
<sup>32</sup>P-CTP Perkin Elmer Life Science (Zaventem, Belgien)  
DECAprimeII Random primed DNA labeling Kit, Ambion (Austin, TX, USA)  
Mouse  $\beta$ -actin DECAprobe Template, Ambion (Austin, TX, USA)

QuickHyb Rapid Solution, Stratagene (La Jolla, CA, USA)

Hybridizationsofen, Bachofer Laboratoriumsgeräte (Reutlingen, BRD)

UVStratalinker1800, Stratagene (La Jolla, CA, USA)

#### *2.1.4 Luciferaseassay*

TRIS, Roth (Karlsruhe, BRD)

Glycerol, Sigma (Deisenhofen, BRD)

Magnesiumchlorid, Merck (Darmstadt, BRD)

Triton x, Sigma (Deisenhofen, BRD)

Titriplex III, Merck (Darmstadt, BRD)

Luciferin, Sigma (Deisenhofen, BRD)

Superfect, Qiagen (Hilden, BRD)

ATP, Amersham Biotech (Freiburg, Deutschland)

Lumat, LB 9507 EG&G Berthold (Bad Wildbach, BRD)

#### *2.1.5 PCR und Vektorvermehrung*

MDTT, Gibco BRL (Paisley, Scotland)

dNTP, Invitrogen (Karlsruhe, BRD)

Randomized Primer, Invitrogen (Karlsruhe, BRD)

Buffer, Invitrogen (Karlsruhe, BRD)

RNasin, Promega (Madison, USA)

AmpliTaq DNA Polymerase, Perkin-Elmer (Foster City, CA, USA)

M-MLV Reverse Transcriptase, Invitrogen (Karlsruhe, BRD)

Primer, ROTH (Karlsruhe, BRD)

GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer (Foster City, CA, USA)

TOPO Cloning Reaction and Transformation Kit, Invitrogen (Karlsruhe, BRD)

TOPO-TA PCR2.1 Vector, Invitrogen (Karlsruhe, BRD)

QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen (Hilden, BRD)

QIAfilter Plasmid Maxi Kit, Qiagen (Hilden, BRD)  
Qiaex II Agarose Gel Extraction Kit, Qiagen (Hilden, BRD)  
QIAquick, Qiagen Nucleotide Removal kits (Hilden, BRD)

#### *2.1.6 Western Blot*

Phenylmethylsulfonylfluoride, Sigma (Deisenhofen, BRD)  
Aprotinine, Sigma (Deisenhofen, BRD)  
Leupeptin, Sigma (Deisenhofen, BRD)  
Triton x, Sigma (Deisenhofen, BRD)  
HEPES, Sigma (Deisenhofen, BRD)  
PVDF-Membrane, Immobilon (Millipore, BRD)  
Röntgenfilm XOMAT-AR, Eastman Kodak (Rochester, NY, USA)  
Röntgenfilm Biomax MS, Eastman Kodak (Rochester, NY, USA)  
Antikörper gegen pSTAT1, pSTAT3, ERK1/ERK2 Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA)  
Antikörper gegen pSTAT5 und pErk1/Erk2, Cell Signaling, Cummings Center (Beverly, MA, USA)  
Antikörper gegen STAT3, STAT1 und STAT5, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)  
Mit Meerrettich Peroxidase konjugierte Antikörper gegen Maus- oder Kaninchen-IgG, Pierce (Rockford, IL, USA).  
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, Pierce (Rockford, IL, USA).

#### *2.1.7 ACTH-Radioimmunassay*

ACTH-RIA, Diagnostic System Laboratories (Webster, TX, USA)  
Tween20, Merck (Darmstadt, BRD)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zelllinien und Zellkultur

Die corticotrophe Tumorzelllinie AtT-20/D16v-F2 wurde in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), welches mit 10% fetalem Kälberserum, 1% Penicillin-Streptomycin, 0,2% Amphotericin B und Glutamin versehen wurde, in einer 5%igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert.

Jeweils zwei Klone von AtT-20 Zellen, die dominant negative STAT3 Mutanten stabil überexprimierten wurden mittels G418 (1 mg/ml) selektiert. Ebenfalls wurden jeweils drei Klone von AtT20-Zellen, die SOCS3 im pCR3.1 Vektor stabil überexprimierten (AtT20-S) und von denjenigen, die mit dem gleichen Vektor, aber ohne SOCS3-Gen, stabil transfiziert (AtT20-M) wurden, mittels G418 (1 mg/ml) selektiert. Die stabile Transfektion und die Charakterisierung dieser Klone wurden bereits beschrieben (3, 17, 58).

Da NNT-1/BSF-3 in 5 mM Natriumzitatpuffer gelöst wurde, verwendeten wir bei allen Versuchen 5 mM Natriumzitat als negative Kontrolle. Diesen Natriumzitatpuffer fügten wir auch bei den Stimulationen mit LIF und CNTF hinzu, die als positive Kontrollen dienten.

### 2.2.2 Northern Blot Analyse

Die SOCS3-Probe wurde mittels wiederholter PCR des zuvor beschriebenen (3) 747 Nukleotide langen Fragmentes des in pCR3.1 ligierten murinen SOCS-3 (Nukleotid 15 bis 762, GeneBank Accession U88328) generiert. Die POMC-Probe wurde mittels wiederholter PCR eines 526 Nukleotide langen Fragmentes des in pCR2.1 ligierten murinen POMC (Nukleotid 58 bis 583, GeneBank Accession NM\_008895) generiert. Alle Fragmente wurden mittels Sequenzanalyse verifiziert.

Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die spezifischen Banden wurden mit QuiaexII® aus dem Gel extrahiert. Das  $\beta$ -Aktin DECAprobe® Stück war ein 1076 kb langes Fragment des  $\beta$ -Aktin-Gens der Maus.

Für die Northern Blots wurden  $1.5-1.8 \times 10^6$  AtT20-Zellen pro 100-mm Dish ausgesät und für 48 Stunden kultiviert. Anschließend wurden sie mit serumfreien DMEM (0,1% BSA) für 16 Stunden vorinkubiert. Das Serum wurde durch frisches serumfreies DMEM ersetzt und die Zellen wurden mit NNT-1/BSF-3, LIF oder CNTF inkubiert. Die RNS wurde mit Trizolreagenz extrahiert. Anschließend wurden 20  $\mu$ g der RNS auf einem 6,4%igen Formaldehyd-Gel mit 1% Agarose aufgetrennt und auf eine Nylonmembran (Hybond-N+) transferiert. Danach erfolgte das „Crosslinking“ der RNS auf die Membran im UV-Licht. Die Proben wurden mit  $^{32}$ P-CTP mittels DECAprime Random Primed DNA Labeling Kit markiert. Die Vorhybridisierung wurde mittels QuickHyb Rapid bei 68 Grad für 2 Stunden ausgeführt. Die  $^{32}$ P-markierte Probe wurde für 5 Minuten zusammen mit 100  $\mu$ g denaturierter Lachssperma-DNS gekocht und hinzugefügt. Die Hybridisierung wurde für 3 Stunden bei sonst gleichen Bedingungen wie die Vorhybridisierung durchgeführt. Die Membranen wurden unter „low-stringency“ Bedingungen zweimal für 20 Minuten in 2xSSC-0,1% SDS bei Raumtemperatur gewaschen und einmal für 40 Minuten unter „high-stringency“ Bedingungen in 0,1x SSC-0,1% SDS bei 60 Grad Celsius. Kodak Biomax MS Filme wurden mit diesen Membranen für 12 bis 72 Stunden bei  $-70$  Grad belichtet.

### *2.2.3 Proteinextraktion und Western Blot Analyse*

Nach einer Stimulation für 0, 2, 5, 10 bzw. 15 Minuten mit NNT-1/BSF-3, CNTF oder LIF wurden die Zellen mit 500 µl Lysispuffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10mM EDTA, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 100 mM NaF und 2 mM Natriumorthovanadate, pH 7,4), dem 1% Triton X-100, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluoride, 2 µg/ml Aprotinin, 20 µM Leupeptin zugefügt wurde, lysiert. Die Lysate wurden mit 13 000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit SDS Sample Puffer (0,25 M Tris HCl, 40% Glycerol, 2% Natriumdodezylsulfat (SDS), 1% Dithiothreitol, Bromophenolblau, pH 8.8) 1:2 verdünnt. Die Proben wurden für 5 Minuten gekocht und auf einem 10%igen SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden innerhalb von 60 Minuten auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert. Die Membran wurde für 30 Minuten in TBS-T Puffer (0,02 M Tris HCl, 0,15 M NaCl, 2% Tween 20, 0,01% Natriumazide) geblockt. Die jeweilige geblockte Membran wurde über Nacht mit Antikörpern gegen pSTAT1 (1:10.000), pSTAT3 (1:40.000), pSTAT5 (1:5.000) und pERK1/ERK2 (1:40.000) inkubiert, die in PBS-T, 0,05 M Natriumphosphat, 0,15 M NaCl, 2% Tween 20 (pH 7) gelöst waren. Nach einem Waschvorgang mit PBS wurde die Membran für zwei Stunden mit einem sekundären, mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Antikörper (IgG, Ziege gegen Maus oder Esel gegen Kaninchen; in Abhängigkeit vom primären Antikörper) inkubiert.

Die Membran wurde gewaschen, für 30 Minuten in ein chemilumineszierendes Substrat Super Signal West Dura getaucht und einem XOMAT-AR Film ausgesetzt. Danach wurde die Membran 'gestripped'. Die Inkubation mit Antikörpern gegen STAT1 (1:20.000), STAT3 (1:40.000), STAT5 (1:40.000) und ERK1/ERK2 (1:40.000) erfolgte wie oben beschrieben.

#### 2.2.4 Luciferaseassay

AtT20-Zellen wurden transient mit einem murinen  $-2757/+929$  SOCS3-Promotor-Luciferase-Konstrukt in einem pGL3Basic Vektor (3) transfiziert. Es wurden  $0,3 \times 10^3$  Zellen pro Loch (6-Loch-Platte) ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Die Transfektion wurde mit Superfect® gemäß der Gebrauchsanweisung durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden nochmals für 24 Stunden kultiviert, bevor sie für 6 Stunden stimuliert wurden. Die Promotoraktivität wurde sowohl in unstimulierten Zellen als auch jeweils nach Stimulation mit NNT-1/BSF-3, CNTF, LIF gemessen. Es wurde der relative Anstieg der Aktivität nach Interleukinstimulation im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Für die Studien mit einem  $-706/+64$  Ratten POMC- Promotor-Luciferase-Konstrukt wurde das gleiche Schema angewendet. Dieses Konstrukt wurde uns freundlicherweise von Dr. Malcolm Low, Vollum Institute, Oregon, USA zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.5 RT-PCR und Sequenzierung

Die Reverse Transkription wurde mit M-MLV Reverse Transcriptase von Invitrogen gemäß der Gebrauchsanleitung durchgeführt. Nach einer initialen Denaturierung bei  $94^\circ\text{C}$  für drei Minuten folgten 40 PCR-Zyklen (Denaturierung bei  $94^\circ\text{C}$  für eine Minute, Annealing bei entsprechender Temperatur für eine Minute und dann Extension bei  $72^\circ\text{C}$  für eine Minute). Schließlich wurde die PCR mit einem Elongationsschritt bei  $72^\circ\text{C}$  für zehn Minuten beendet. DMSO wurde hinzugefügt und lag in einer Konzentration von 5% vor.

Die RT-PCR-Produkte aus AtT20-Zellen wurden mit Gelelektrophorese (1,2% Agarose) analysiert. Die spezifischen Banden wurden aus dem Gel extrahiert, mittels QuiaexII® gereinigt und anschließend in den pCR2.1 Vektor ligiert. Die

Sequenzierung wurde von Medigenomix (München, Deutschland) durchgeführt und bestätigte die Sequenzidentität.

	Genbank Accession Number	Fragment- länge	Sense-Primer	Antisense-Primer	Annealing Temperatur
CNTFR $\alpha$ Nukleotid 359-926	NM_0166 73	567nt	5'-GCTCAACGG CTCTCAGCTGA TACTG-3'	5'-CACATGCTGC CATTGGTCCAGG ATG-3'	58°C
LIFR Nukleotid 2618-2935	NM_0135 84	315nt	5'-AGCATCCTT TGCTATCGGAA GC-3'	5'-CGTTATTTCC TCCTCGATGAT GG-3'	56°C
gp130 Nukleotid 1863-2552	X62646	689nt	5'-CGTACACAG ATGAAGGTGGG AAAG-3'	5'-CTTCAGGCTG ACTGCAGTTCT GC-3'	58°C

Tab. 1 Bei der PCR verwendeten Primer-Sequenzen

### 2.2.6 ACTH-Radioimmunoassay

Für die Studien der ACTH-Sekretion, wurden die AtT20-Zellen (7000/Loch, 32er Lochplatte) für 48 Stunden in DMEM kultiviert, anschließend für weitere 24 Stunden mit DMEM, dem 1% FKS zugesetzt war. Danach wurden die Zellen mit frischem DMEM (mit 1% FKS) und mit NNT-1/BSF-3, LIF oder CNTF inkubiert.

Bei den M- und S-Klonen verwendeten wir hingegen 14 000 Zellen pro Loch (32er Lochplatte) bei sonst gleichen Bedingungen.

Nach 24 und 48 Stunden wurden die Überstände gesammelt und mittels einem kommerziellen Radioimmunoassay für ACTH der Firma Diagnostic System Laboratories gemessen. Die Qualitätskontrolle des kommerziell erworbenen RIAs ergab Intraassayvariationen von 6,9%, 5,9% bzw. 5,3% und Interassayvariationen von 9,6%, 4,0% bzw. 7,3%. Die unterste Nachweisgrenze lag bei 3,5 pg/ml.

### 2.2.7 Statistik

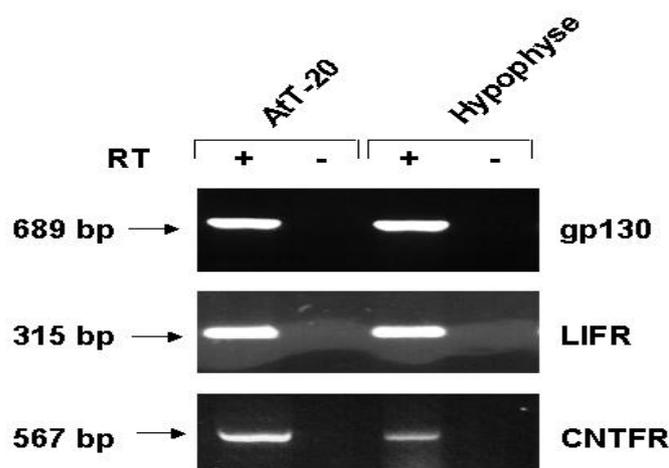
Die Densitometrie spezifischer Banden in den Western Blots und Northern Blots wurde mit dem NIH Image 1.59 Computerprogramm vorgenommen. Die statistischen Analysen wurden mit dem JMP 5.0.1. Computerprogramm durchgeführt. Die statistischen Analysen zwischen den Mittelwerten verschiedener Gruppen und dem Mittelwert einer einzelnen Kontrollgruppe erfolgten mit 'Dunnett's test for multiple comparisons'. Die statistischen Analysen zwischen den Mittelwerten aller Gruppen wurden mit dem 'Tukey-Kramer HSD test for multiple comparisons' durchgeführt. Die statistischen Analysen des paarweisen Vergleiches zwischen dem Mittel einer einzelnen Gruppe und dem Mittel einer einzelnen Kontrollgruppe wurden mit dem 'Student's t-test' vorgenommen. Alle Werte werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Bei den Experimenten wurden jeweils mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Bei den Experimenten mit den verschieden stabil transfizierten AtT-20-Klonen (AtT20-M, AtT20-L, AtT20-F, AtT20-D und AtT20-W) wurden jeweils drei bzw. zwei verschiedene Klone pro Gruppe verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Expression des funktionellen CNTF-Rezeptors in AtT20-Zellen und in murinen Hypophysen

Da der trimere CNTF-Rezeptor-Komplex (CNTFR $\alpha$ /LIFR/gp130) für die Bindung von NNT-1/BSF-3 an die Zelloberfläche notwendig ist, wurde zunächst mittels RT-PCR untersucht, ob gp130, LIFR und CNTFR $\alpha$  von AtT20-Zellen exprimiert werden.

Die RT-PCR wurde sowohl an mRNA aus AtT20-Zellen als auch an Hypophysen von C57BL/6 Mäusen durchgeführt. Ein 567 nt langes Fragment der murinen CNTFR $\alpha$  cDNS (nt 359-926, Genbank Accession NM\_016673), ein 315 nt langes Fragment der murinen LIFR cDNS (nt 2618-2935, Genbank Accession NM\_013584) und ein 689 nt langes Fragment der murinen gp130 cDNS (nt 1863-2552, Genbank Accession X62646) wurden erzeugt (siehe Tabelle 1 Seite 19) und konnte sowohl in AtT20-Zellen als auch in murinen Hypophysenzellen nachgewiesen werden (Abb. 3).



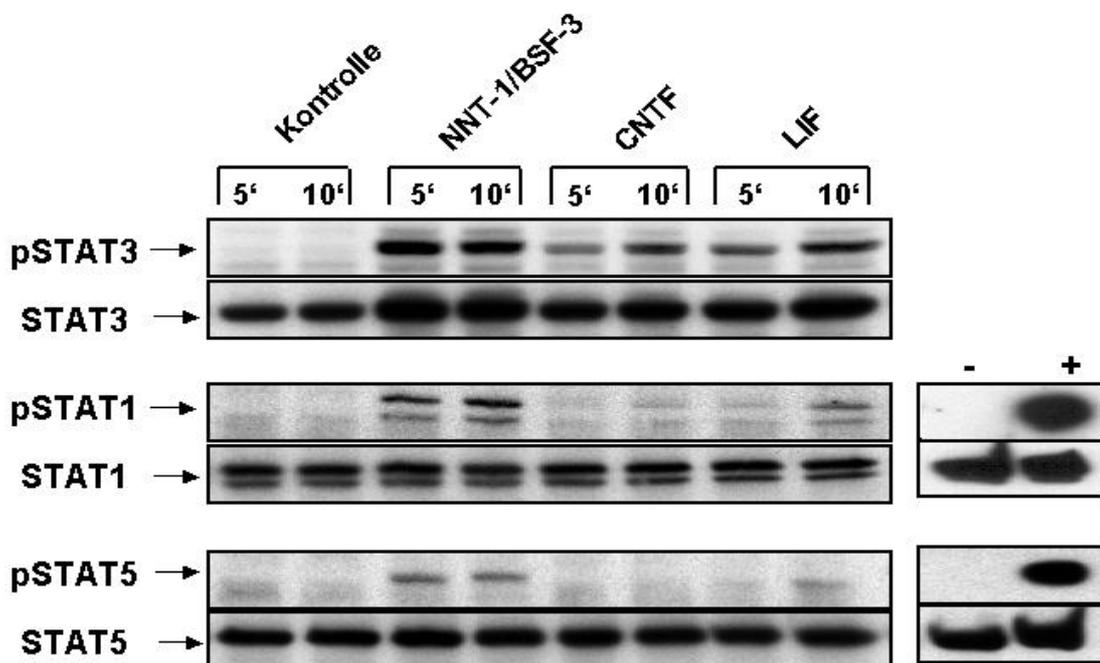
**Abb. 3. Expression von gp130, LIFR und CNTFR $\alpha$  mRNA in murinen AtT20-Zellen und Hypophysengewebe.**

Die RT-PCR wurde mit RNA durchgeführt, die aus AtT20-Zellen und Lysaten von murinen Hypophysengewebe gewonnen wurde. RT+: mit reverse Transkription; RT-: ohne reverse Transkription. Ein 689 bp langes Fragment der murinen gp130 cDNS, ein 315 bp langes Fragment der murinen LIFR cDNS und ein 567 bp langes Fragment der murinen CNTFR $\alpha$  cDNS wurden erzeugt. Die Spezifität der gewonnenen Banden wurde mittels Sequenzanalysen bestätigt.

## 3.2 NNT-1/BSF-3 aktiviert die Jak-STAT-Kaskade in AtT20-Zellen

### 3.2.1 STAT-Phosphorylierung

Während in unstimulierten Zellen weder STAT1- noch STAT3-Phosphorylierung nachweisbar war, zeigte sich nach Stimulation von AtT20-Zellen mit NNT-1/BSF-3 eine Tyrosinphosphorylierung sowohl von STAT1 als auch von STAT3 (Abb. 4). Anhand von Densitometrieanalysen wurde das Verhältnis phosphorylierter STAT-Proteine zu STAT-Proteinen insgesamt für jede Gruppe berechnet (pSTAT/STAT). Das Verhältnis pSTAT/STAT der LIF-Gruppe (Positivgruppe) wurde gleich 1 gesetzt. Relative STAT-Phosphorylierung jeder Gruppe wurde im Vergleich zu dieser Positivkontrolle berechnet. Bei Stimulation mit LIF (Positivkontrolle) zeigte sich ein signifikanter Anstieg sowohl des phosphorylierten STAT3-Proteins ( $p < 0.001$ ) als auch des phosphorylierten STAT1-Proteins ( $p < 0.05$ ) nach 5 und 10 Minuten im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe.



**Abb. 4. NNT-1/BSF-3 und CNTF induzieren die STAT-Proteinaktivierung.**

AtT20-Zellen wurden mit 10 ng/ml NNT-1/BSF-3, CNTF oder LIF für 5 bzw. 10 Minuten inkubiert. Phosphorylierte Tyrosine der STAT3-, STAT1- und STAT5-Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen (obere Banden). Mittels Antikörper gegen STAT3-, STAT1- und STAT5-Proteine wurde gezeigt, dass immer die gleiche Menge an Proteinen geladen war (untere Banden).

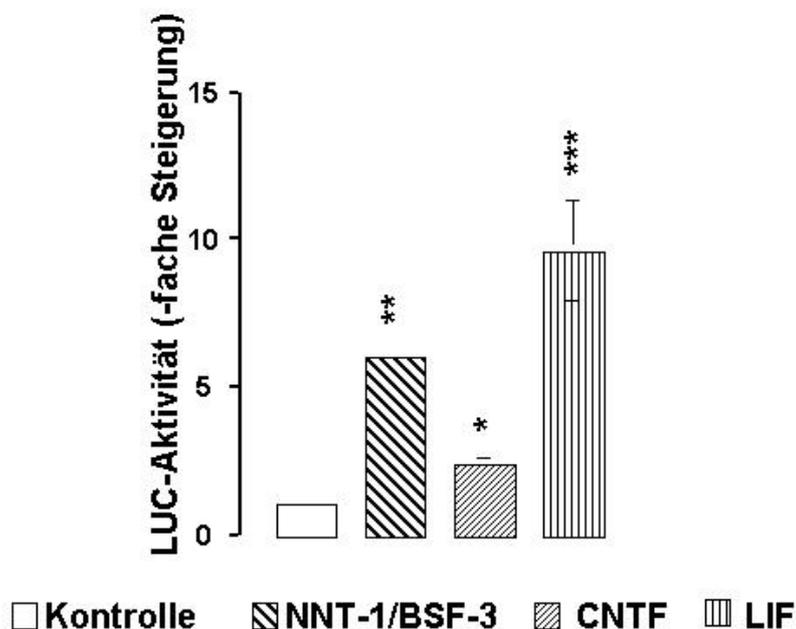
Auch mit NNT-1/BSF-3 ließ sich die Phosphorylierung der STAT-Proteine signifikant induzieren. Es kam zu einer Zunahme der pSTAT3-Proteine ( $p < 0.001$ ) und der pSTAT1-Proteine ( $p < 0.001$ ) nach 5 und 10 Minuten, die im Verhältnis zur LIF-Positivkontrolle mit  $1.3 \pm 0.2$  (5 Minuten) und  $1.1 \pm 0.1$  (10 Minuten) beziehungsweise  $2.1 \pm 0.4$  (5 Minuten) und  $1.5 \pm 0.4$  (10 Minuten) höher war.

Die Inkubation mit 10 ng/ml CNTF induziert eine signifikante Stimulation von pSTAT3 nach 5 Minuten ( $p < 0.05$ ) und 10 Minuten ( $p < 0.001$ ) im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Das durch CNTF-induzierte Verhältnis pSTAT3/STAT3 ist mit  $0.5 \pm 0.1$  und  $0.6 \pm 0.1$  nach 5 und 10 Minuten geringer als das durch LIF-induzierte. Es zeigte sich bei CNTF-Stimulation kein signifikanter Anstieg von pSTAT1.

Wir beobachteten keine Tyrosinphosphorylierung von STAT5, ERK1 oder ERK2 in AtT20-Zellen bei einer Stimulation mit einem der genannten Zytokine (Daten zu ERK1 und 2 nicht gezeigt). Als Positivkontrolle verwendeten wir Y1-Zellen, die mit mOSM stimuliert wurden.

### 3.2.2 SOCS-3-Genexpression

AtT20-Zellen wurden transient mit einem SOCS-LUC-Konstrukt transfiziert. Die Reporterogenaktivität der unstimulierten Kontrollzellen wurde gleich 1,0 gesetzt und die Aktivität der stimulierten Zellen als -fache Steigerung berechnet. Im Verhältnis zu unbehandelten pGL3Basic-SOCS3-LUC transfizierten AtT20-Zellen, führte die Stimulation mit NNT-1/BSF-3 führte zu einem signifikanten Anstieg der Luciferase-Aktivität um den Faktor  $6 \pm 1$  ( $p < 0.01$ ). Ebenfalls ließ sich die Aktivität des Promotors durch Stimulation mit CNTF und LIF signifikant induzieren ( $2.4 \pm 0.2$ ,  $p < 0.05$  bzw.  $9.6 \pm 1.7$ ,  $p < 0.001$ ) (Abb. 5). Dagegen zeigte sich keine Steigerung der Luciferase-Aktivität in den AtT-20 Zellen, die nur mit pGL3Basic alleine transfiziert worden waren (Negativkontrolle) (Daten nicht gezeigt).



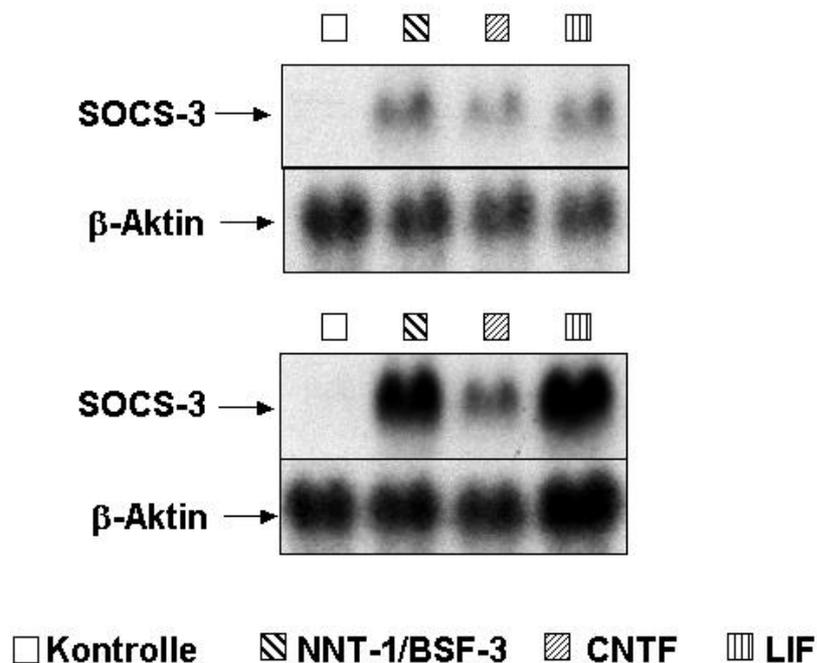
**Abb. 5. NNT-1/BSF-3 und CNTF induzieren die STAT-abhängige SOCS3-Promotor-Aktivität.**

AtT20-Zellen wurden transient mit einem -2757 / +929 murinen SOCS3-Promotor-Luciferase-Konstrukt transfiziert und mit 10 ng/ml NNT-1/BSF-3, CNTF und LIF (Positivkontrolle) für 6 Std. inkubiert. Die Reporterogenaktivität der unstimulierten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 1.0 gesetzt und die Aktivität der stimulierten Zellen wurde als -fache Steigerung berechnet.

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

LUC: Luciferase

Um den Effekt von NNT-1/BSF-3 auf die mRNA-Expression von SOCS3 zu untersuchen, wurden AtT-20-Zellen mit NNT-1/BSF-3 für 30, 60 und 120 Minuten stimuliert. Northern Blot Analysen zeigten ein SOCS3-spezifisches Signal bei einer Transkriptgröße von ungefähr 2.8 Kilobasenpaaren. Im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen zeigte sich nach NNT-1/BSF-3-Stimulation ein schneller Anstieg der SOCS3-mRNA nach 30 und 60 Minuten. Bereits nach 120 Minuten nahm die mRNA wieder ab. Die SOCS3 mRNA-Expression ließ sich durch Stimulation mit NNT-1/BSF-3 nach 60 Minuten um den Faktor 11 ( $p < 0.001$ ) erhöhen. Die SOCS3-Expression ließ sich ebenfalls mit CNTF und mit LIF stimulieren. Hier zeigte sich eine 7-fache ( $p > 0.05$ ) bzw. 13-fache ( $p < 0.01$ ) Stimulation nach 60 Minuten (Abb. 6). Während NNT-1/BSF-3 und LIF eine ähnlich starke Potenz auf die SOCS3 mRNA-Expression aufweisen, scheint CNTF ein geringerer Stimulus der SOCS3 mRNA-Expression zu sein.

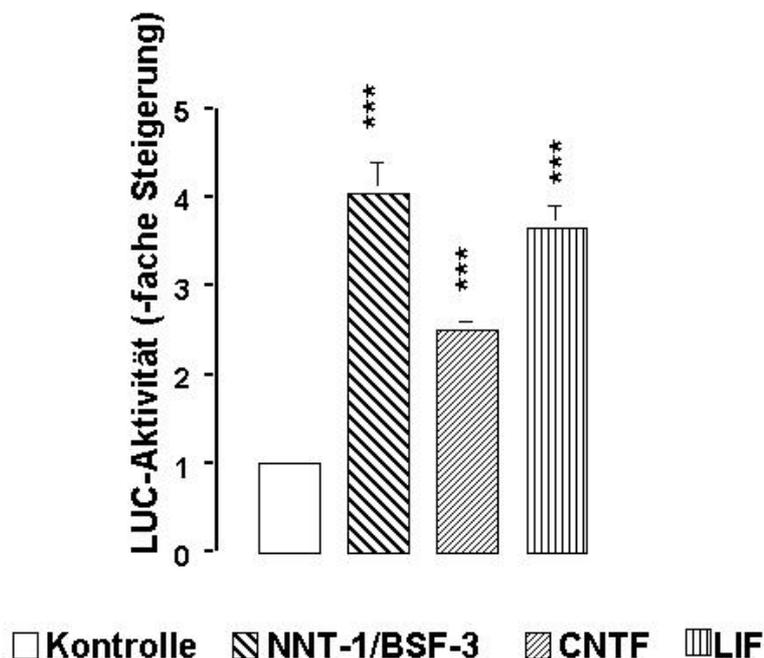


**Abb. 6. NNT-1/BSF-3 und CNTF induzieren die SOCS3 mRNA-Expression.**  
 AtT20-Zellen wurden mit 10 ng/ml NNT1-BSF-3, CNTF oder LIF (Positivkontrolle) für 30 und 60 Minuten stimuliert. Die SOCS3mRNA-Expression wurde mittels NorthernBlot-Analysen bestimmt.

### 3.3 NNT-1/BSF-3 induziert die Expression von POMC und die ACTH-Sekretion

#### 3.3.1 Expression von POMC

Wir untersuchten den Effekt von NNT-1/BSF-3 auf die Aktivität des POMC-Promotors. Hierfür wurden AtT-20 transient mit einem  $-706/+64$ -POMC-Promotor-Luciferase-Konstrukt transfiziert. Eine hohe basale Luciferase-Aktivität zeigte die erfolgreiche Transfektion an. NNT-1/BSF-3 erhöhte die Luciferaseaktivität um den Faktor  $4 \pm 0.3$  ( $p < 0.001$ ). Ebenso zeigte sich eine Erhöhung der Aktivität nach CNTF- bzw. LIF-Stimulation um den Faktor  $2.5 \pm 0.2$  ( $p < 0.01$ ) bzw.  $3.6 \pm 0.25$  ( $p < 0.001$ ) (Abb. 7).



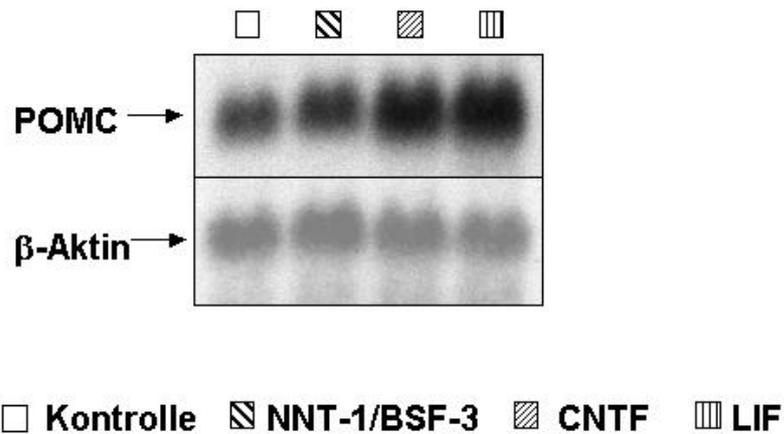
**Abb. 7. NNT-1/BSF-3 und CNTF induzieren die STAT-abhängige POMC-Promotor-Aktivität.**

AtT20-Zellen wurden transient mit einem  $-706 / +64$  Ratten-POMC-Promotor-Luciferase-Konstrukt transfiziert und mit 10 ng/ml NNT-1/BSF-3, CNTF und LIF (Positivkontrolle) für 6 Std. inkubiert. Die Reportergenaktivität der unstimulierten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 1.0 gesetzt und die Aktivität der stimulierten Zellen wurde als -fache Steigerung berechnet.

\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$

LUC: Luciferase

Anhand von Northern Blot Analysen ließ sich in unstimulierten AtT-20-Zellen eine basale Genexpression von POMC-mRNS nachweisen. Nach einer Inkubation mit NNT-1/BSF-3 für 24 Stunden ließ sich keine signifikante Erhöhung der Genexpression (1.25-fach) zeigen. Hingegen ließ sich die POMC mRNS-Expression mit CNTF 1.9-fach ( $p < 0.05$ ) und mit LIF 2.4-fach ( $p < 0.01$ ) stimulieren (Abb. 8).

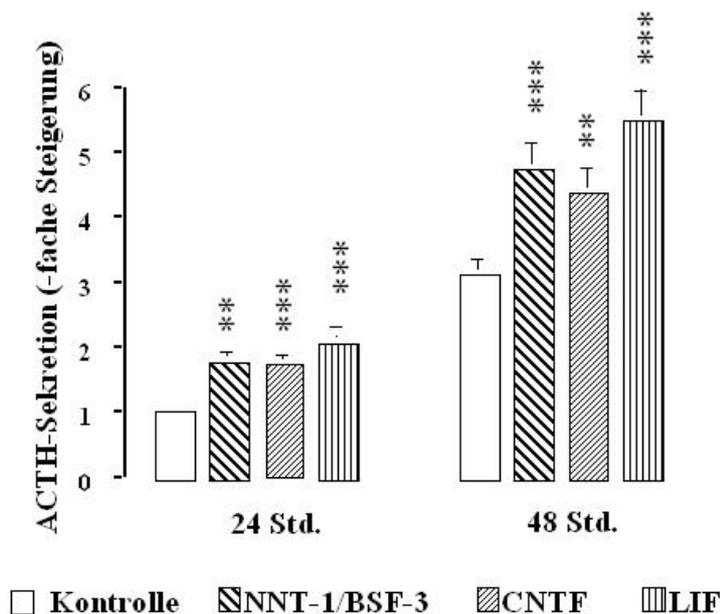


**Abb. 8. NNT-1/BSF-3 und CNTF induzieren die POMC mRNS-Expression.**  
AtT20-Zellen wurden mit 10 ng/ml NNT1-BSF-3, CNTF oder LIF (Positivkontrolle) für 24 Std. stimuliert. Die POMCmRNS-Expression wurde mittels NorthernBlot-Analysen bestimmt.

### 3.3.2 Stimulierung der ACTH-Sekretion

Um die Wirkung der Zytokine auf die ACTH-Sekretion der AtT20-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit jeweils 10 ng/ml NNT-1/BSF-3, CNTF und LIF stimuliert. Die ACTH-Konzentrationen nach 24 und 48 Stunden wurden mittels eines Radioimmunassays gemessen.

Die basalen ACTH-Werte (bei Kontrollpuffer) nach 24 und 48 Stunden waren  $180 \pm 40$  pg/ml und  $555 \pm 110$  pg/ml; es zeigte sich also ein Anstieg um das  $3.1 \pm 0.3$ -fache nach 48 Stunden. Eine Stimulation mit NNT-1/BSF-3 bewirkte einen  $1.7 \pm 0.2$ - ( $p < 0.05$ ) bzw.  $4.7 \pm 0.4$ -fachen ( $p < 0.001$ ) Anstieg der ACTH-Sekretion nach 24 bzw. 48 Stunden (bezogen auf die ACTH-Sekretion der Kontrollgruppe nach 24 Stunden). CNTF löste nach 24 Stunden ebenfalls eine Stimulation von  $1.7 \pm 0.15$ -fach ( $p < 0.05$ ), dagegen nach 48 Stunden eine von  $4.4 \pm 0.4$ -fach ( $p < 0.001$ ) aus. Eine stärkere Stimulation zeigte sich hingegen mit LIF. Nach 24 Stunden stieg die ACTH-Sekretion um den Faktor  $2.1 \pm 0.25$  ( $p < 0.001$ ) bzw. nach 48 Stunden um  $5.5 \pm 0.5$  ( $p < 0.001$ ) (Abb. 9).

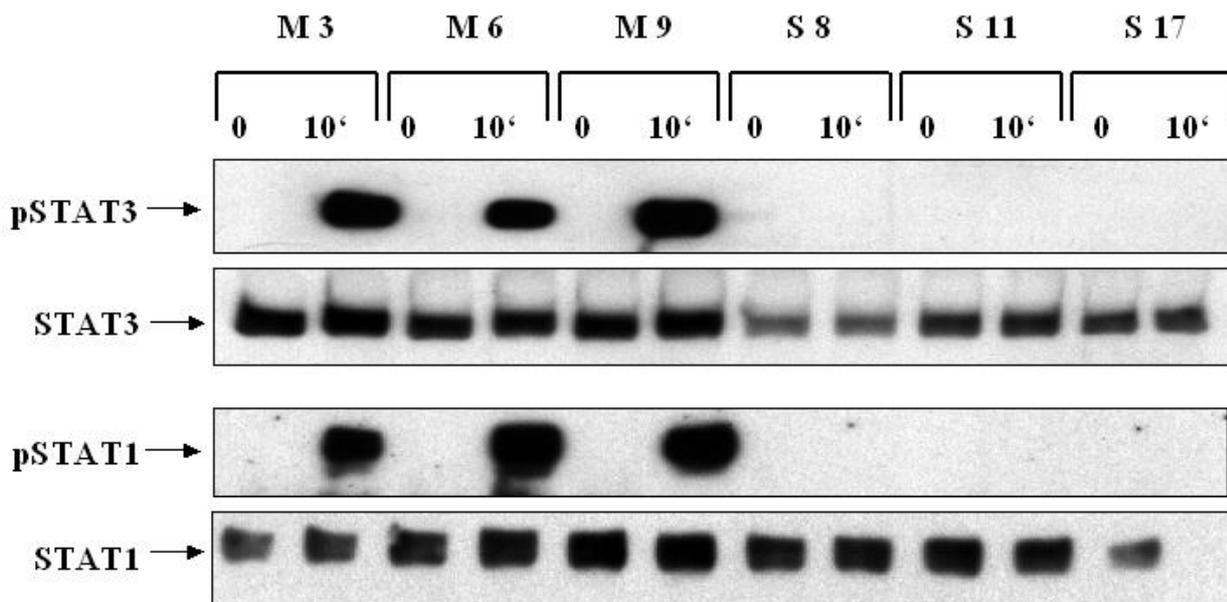


**Abb. 9. NNT-1/BSF-3 und CNTF induzieren die ACTH-Sekretion.**  
 AtT20-Zellen wurden mit 10 ng/ml NNT-1/BSF-3, CNTF und LIF (Positivkontrolle) für 24 und 48 Std. stimuliert. Die ACTH-Sekretion wurde mittels eines Radioimmunassay bestimmt. Die ACTH-Sekretion der unstimulierten Zellen (Kontrolle) wurde gleich 1.0 gesetzt und die Sekretion der stimulierten Zellen wurde als -fache Steigerung berechnet.  
 \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$

### 3.4 Effekte von NNT-1/BSF-3 in SOCS3 überexprimierenden AtT20- Zellen

#### 3.4.1 Hemmung der STAT-Phosphorylierung

Die stabile Überexpression von SOCS-3 in kortikotrophen AtT20-Zellen (AtT20-S) inhibiert die NNT-1/BSF-3-induzierte Tyrosinphosphorylierung sowohl von STAT3 als auch von STAT1. Dies zeigten Western Blot Analysen. In den AtT20-S-Zellen ließ sich die Phosphorylierung der STAT-Proteine durch NNT-1/BSF-3 nicht stimulieren. Hingegen zeigte sich eine NNT-1/BSF-3-induzierte STAT-Phosphorylierung in den Kontrollzellen, bei denen der leere Vektor stabil transfiziert wurde (AtT20-M) (Abb. 10).

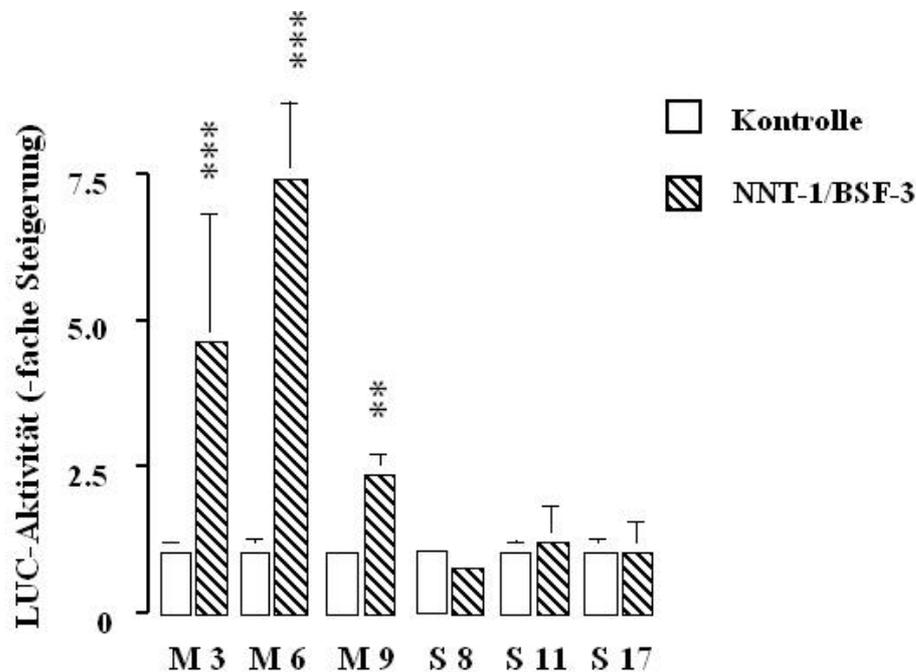


**Abb. 10. Inhibition der NNT-1/BSF-3-induzierten STAT-Aktivierung vermittelt durch SOCS3.**

Drei verschiedene Zellklone mit stabiler SOCS3-Überexpression (S) sowie drei verschiedene Klone der Kontrollzellen (M) wurden mit 10 ng/ml NNT-1/BSF-3 für 10 Min. inkubiert. Phosphorylierte Tyrosine der STAT3- und STAT1-Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen (obere Bande). Eine gleichmäßige Proteinladung ließ sich mit Antikörpern gegen STAT3- und STAT1-Proteinen bestätigen (untere Bande).

### 3.4.2 Effekte auf STAT-abhängige Promotoraktivitäten

Wir haben gezeigt, dass NNT-1/BSF-3 die POMC-Promotor-Aktivität erhöht. Um zu untersuchen, ob sich die POMC-Genexpression durch SOCS3 hemmen lässt, haben wir AtT-20-Zellen, die SOCS3 stabil überexprimierten (AtT-20-S), sowie die Kontrollzellen (AtT-20-M) mit einem  $-706/+64$ -POMC-Promotor-Luciferase-Konstrukt transient kotransfiziert. NNT-1/BSF-3-Stimulation der kotransfizierten AtT-20-M führte zu einer um den Faktor  $4.6 \pm 0.5$  (2.4- bis 6.9) ( $p < 0.001$ ) erhöhten POMC-Promotor-Aktivität, während in den kotransfizierten AtT-20-S eine gleichbleibende Aktivität ( $1.0 \pm 0.1$ ) (1.0 bis 1.2) beobachtet wurde. Der gleiche Effekt ließ sich auch mit LIF auslösen. Bei den AtT-20-M ließ sich eine  $3.5 \pm 0.3$  -fache ( $p < 0.001$ ) Stimulation hervorrufen, während bei AtT-20-S nur eine  $1.0 \pm 0.1$  -fache Aktivität vorhanden war (Abb. 11).

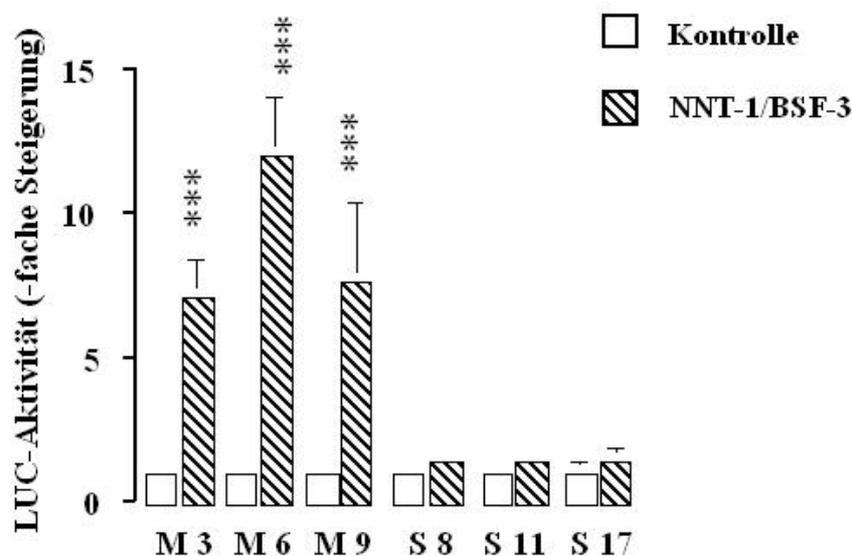


**Abb. 11. Inhibition der NNT-1/BSF-3-induzierten Aktivierung des STAT-abhängigen POMC-Promotors.**

Drei verschiedene Zellklone mit stabiler SOCS3-Überexpression (S) sowie drei verschiedene Klone der Kontrollzellen (M) wurden transient mit einem  $-706 / +64$  Ratten-POMC-Promotor-Luciferase-Konstrukt transfiziert. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml NNT-1/BSF-3 für 6 Std. stimuliert. Für jeden Zellklon wurde die Reporteraktivität der unstimulierten Zellen gleich 1.0 gesetzt und die Aktivität der stimulierten Zellen wurde als -fache Steigerung berechnet.

\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$

Da SOCS3 seine eigene Expression hemmt, zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der NNT-1/BSF-3-induzierten SOCS-Promotor-Aktivität. Hierfür kotransfizierten wir die AtT-20-S- und AtT-20-M-Klone mit einem SOCS-3-Promotor-Luciferase-Konstrukt. Bei den AtT-20-M zeigte sich eine Aktivierung des Promotors um den Faktor  $8.9 \pm 0.6$  (7.0 bis 12.0) ( $p < 0.001$ ) nach Stimulation mit NNT-1/BSF-3. In den AtT-20-S war dagegen nur eine Erhöhung um  $1.4 \pm 0.1$  (1.3 bis 1.6) auslösbar. Diese Hemmung zeigte sich auch bei einer Stimulation mit LIF. In den AtT-20-M stieg die Aktivität des Promotors um den Faktor  $10.4 \pm 0.8$  ( $< 0.001$ ) bzw. in den AtT-20-S nur um den Faktor  $1.4 \pm 0.1$  (Abb. 12).



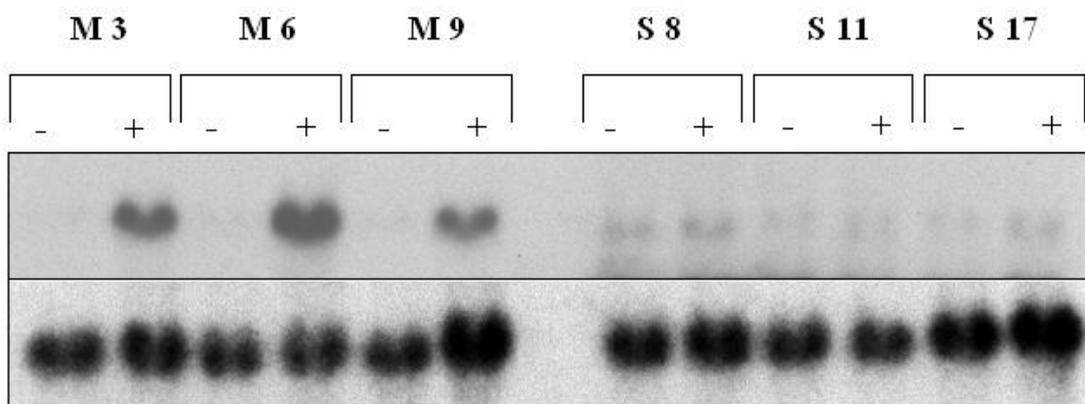
**Abb. 12. Inhibition der NNT-1/BSF-3-induzierten Aktivierung des STAT-abhängigen SOCS3-Promotors.**

Drei verschiedene Zellklone mit stabiler SOCS3-Überexpression (S) sowie drei verschiedene Klone der Kontrollzellen (M) wurden transient mit einem -2757 / +929 murinen SOCS3-Promotor-Luciferase-Konstrukt transfiziert. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml NNT-1/BSF-3 für 6 Std. stimuliert. Für jeden Zellklon wurde die Reporteraktivität der unstimulierten Zellen gleich 1.0 gesetzt und die Aktivität der stimulierten Zellen wurde als -fache Steigerung berechnet.

\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$

### 3.4.3 Inhibition der endogenen SOCS3-Genexpression in den SOCS3-überexprimierenden Zellen

Der hemmende Effekt auf die SOCS3-Genexpression ließ sich ebenfalls in Northern Blot Analysen beobachten. Nach einer Stimulation mit NNT-1/BSF-3 für 30 und 60 Minuten zeigte sich in den AtT-20-M ein deutlicher Anstieg der SOCS3-mRNS. In den AtT-20-S ließ sich im Gegensatz dazu nur eine minimale Steigerung der Genexpression durch NNT-1/BSF-3 nachweisen (Abb. 13).

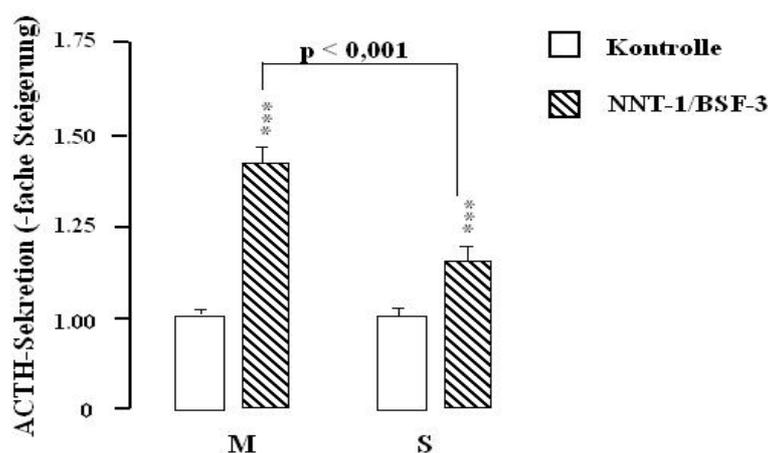


**Abb. 13. Inhibition der NNT-1/BSF-3-induzierten STAT-abhängigen SOCS3-Expression vermittelt durch exogenes SOCS3.**

Drei verschiedene Zellklone mit stabiler SOCS3-Überexpression (S) sowie drei verschiedene Klone der Kontrollzellen (M) wurden mit 10 ng/ml NNT-1/BSF-3 für 30 Min. inkubiert. Die SOCS3-Expression wurde mittels NorthernBlot-Analysen bestimmt.

### 3.4.4 Wirkungen auf die ACTH-Sekretion

Als nächstes wurde untersucht, ob SOCS3 in AtT-20-Zellen als negativer Regulator auf die NNT-1/BSF-3-induzierte ACTH-Sekretion wirkt. Auch hier zeigte sich der hemmende Effekt von SOCS3. In den SOCS3-überexprimierenden Zellen (AtT20-S) waren die basalen ACTH-Werte  $205 \pm 8$  pg/ml. Hingegen war die basale ACTH-Sekretion bei den Kontrollzellen AtT20-M höher ( $325 \pm 17$  pg/ml). Stimulation der AtT20-M-Zellen mit NNT-1/BSF-3 bewirkte eine Erhöhung der ACTH-Sekretion nach 48 Stunden um den Faktor  $1,4 \pm 0,04$  ( $p < 0.001$ ) bezogen auf die Sekretion bei Stimulation mit dem Kontrollpuffer (M3:  $335 \pm 12$  vs.  $227 \pm 17$  pg/ml,  $p < 0.001$ ; M6:  $284 \pm 9$  vs.  $226 \pm 12$  pg/ml,  $p < 0.05$ ; M9:  $331 \pm 11$  vs.  $270 \pm 10$  pg/ml,  $p < 0.05$ ). Auch bei LIF stieg die ACTH-Sekretion auf den  $1,7 \pm 0,06$ -fachen Wert ( $p < 0.001$ ) an. Dagegen fiel die Stimulation der ACTH-Sekretion bei den AtT20-S-Zellen signifikant geringer aus (NNT-1/BSF-3  $p < 0.001$ , LIF  $p < 0.01$ ). NNT-1/BSF-3 bewirkte einen  $1,1 \pm 0,04$ -fachen Anstieg des ACTH-Levels (S8:  $191 \pm 14$  vs.  $163 \pm 12$  pg/ml; S11:  $140 \pm 12$  vs.  $140 \pm 13$  pg/ml; S17:  $165 \pm 15$  vs.  $155 \pm 16$  pg/ml) und LIF einen  $1,5 \pm 0,06$ -fachen (Abb.14).

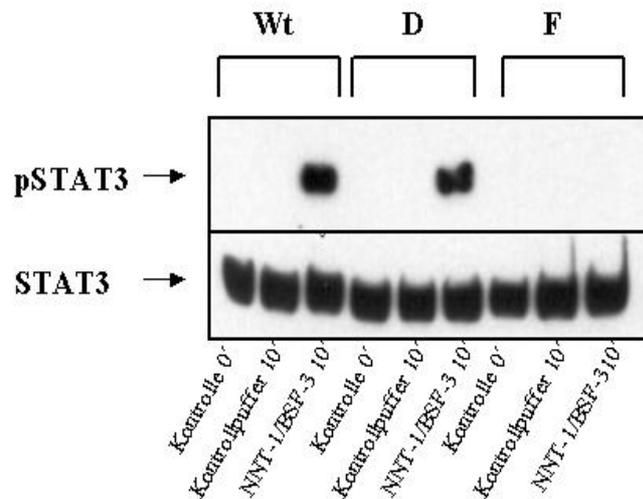
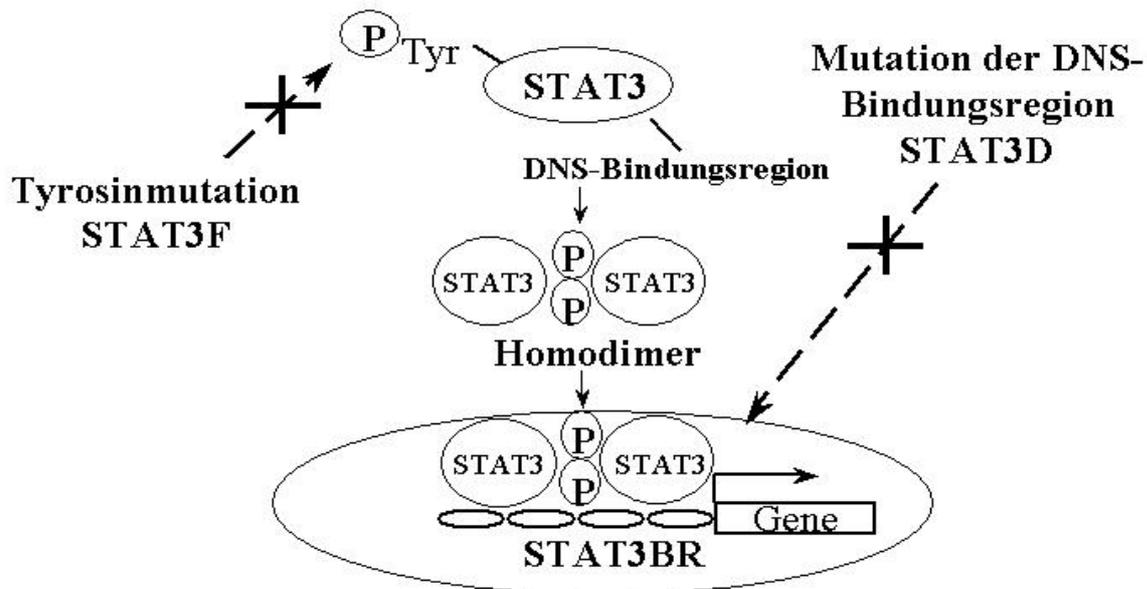


**Abb. 14. Inhibition der NNT-1/BSF-3-induzierten ACTH-Sekretion vermittelt durch SOCS3.** Drei verschiedene Zellklone mit stabiler SOCS3-Überexpression (S) sowie drei verschiedene Klone der Kontrollzellen (M) wurden mit 10 ng/ml NNT-1/BSF-3 für 48 Std. inkubiert. Die ACTH-Sekretion wurde anhand eines Radioimmunassays bestimmt. Für jeden Zellklon wurde die ACTH-Sekretion der unstimulierten Zellen gleich 1.0 gesetzt und die Aktivität der stimulierten Zellen wurde als -fache Steigerung berechnet. Hier sind die Mittelwerte der vier voneinander unabhängig durchgeführten Experimente aller L- und M-Klone.  
\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$

### *3.5. Effekte von NNT1/BSF-3 in STAT3 dominant negativ mutierten AtT20-Zellen*

#### *3.5.1 STAT3-Phosphorylierung*

Wir haben gezeigt, dass NNT-1/BSF-3 in AtT-20-Zellen die Jak-STAT-Kaskade aktiviert. Um die Bedeutung von STAT3 in der Signalinduktion durch NNT-1/BSF-3 zu untersuchen, haben wir AtT-20 Zellen, die dominant negative STAT3-Mutanten stabil überexprimieren, mit NNT-1/BSF-3 stimuliert. Bei der STAT3F-Mutante wurde die Aminosäure Tyrosin<sup>705</sup> durch Phenylalanin<sup>705</sup> ersetzt, wodurch die Tyrosinphosphorylierung gestört ist. Hingegen ist bei der STAT3D-Mutante die Stelle verändert worden, die für die DNS-Bindung wichtig ist (58). Als Kontrollzellen verwendeten wir Zellen, die den Wildtyp STAT-3 stabil überexprimieren (STAT3W) (17) (Abb. 15). Entsprechend den Mutationen zeigte sich in Western Blot Analysen keine signifikante Tyrosinphosphorylierung nach NNT-1/BSF-3-Stimulation bei den STAT3F-Klonen. Bei den STAT3D- bzw. STAT3W-Mutanten zeigte sich hingegen eine Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung (Abb. 15).



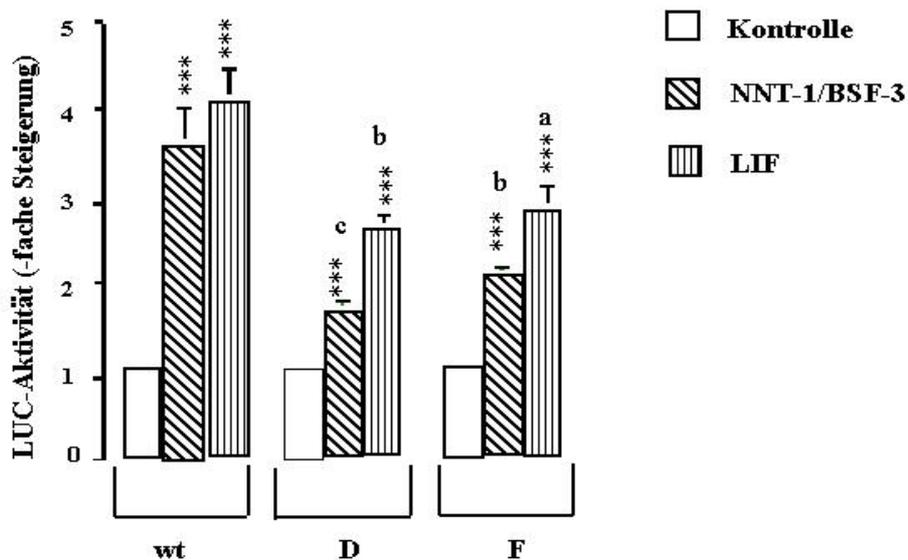
**Abb. 15. Dominant negative STAT3-Mutanten.**

Bei den STAT3F-Klonen wurde Tyrosin705 durch Phe705 ersetzt. Dies hat eine Störung der Tyrosinphosphorylierung zur Folge. Dadurch kommt es nicht zur Aktivierung der STAT-Proteine. Hingegen liegt bei den STAT3D-Klonen eine Mutation der DNS-Bindungsregion (STAT3BR) vor. Hierdurch können die STAT-Proteine nicht mehr an die DNS binden. Es kommt also nicht zur Induktion der Genexpression.

Der untere Abschnitt der Abbildung zeigt Western Blot-Analysen jeweils eines repräsentativen Klons. Entsprechend den Mutationen zeigt sich eine Aktivierung der Tyrosinphosphorylierung der STAT3-Proteinen durch NNT-1/BSF-3 bei dem Wildtyp (Wt)- als auch bei dem D-Klon. Hingegen ließ sich die Phosphorylierung bei dem F-Klon nicht stimulieren.

### 3.5.2 Wirkungen auf STAT-abhängige Promotoraktivitäten

Wir kotransfizierten die STAT3F-, STAT3D- und STAT3W-Klone mit einem SOCS3-Promotor-Luciferase-Konstrukt. In den Zellen, die STAT3W überexprimierten, zeigte sich eine NNT-1/BSF-3 induzierte Aktivierung des Promotors um den Faktor  $3.6 \pm 0.4$  ( $p < 0.001$ ). Dagegen war die Stimulation des Promotors in den Zellen mit STAT3D und STAT3F abgeschwächt ( $1.6 \pm 0.1$ ,  $p < 0.01$  bzw.  $2.0 \pm 0.1$ ,  $p < 0.001$ ). Es zeigte sich demnach eine im Vergleich zu den STAT3W-Klonen 56%-ige bzw. 45%-ige geringere Aktivierung ( $p < 0.001$  bzw.  $< 0.001$ ). Dieser Effekt ließ sich auch mit LIF hervorrufen, jedoch fiel hier die Reduktion geringer aus. Bei den AtT-20 mit STAT3W stieg die Promotoraktivität nach LIF-Stimulation um  $4.0 \pm 0.4$  ( $p < 0.001$ ). Dagegen zeigte sich bei den Mutanten mit STAT3D und STAT3F nur eine Stimulation von  $2.6 \pm 0.2$  ( $p < 0.001$ ) bzw.  $2.8 \pm 0.3$  ( $p < 0.001$ ). Folglich fiel die Aktivierung des Promotors in den STAT3D- und STAT3F-Mutanten im Vergleich zu den STAT3W-Klonen 35% bzw. 30% geringer ( $p < 0.01$  bzw.  $< 0.01$ ) aus (Abb. 16).



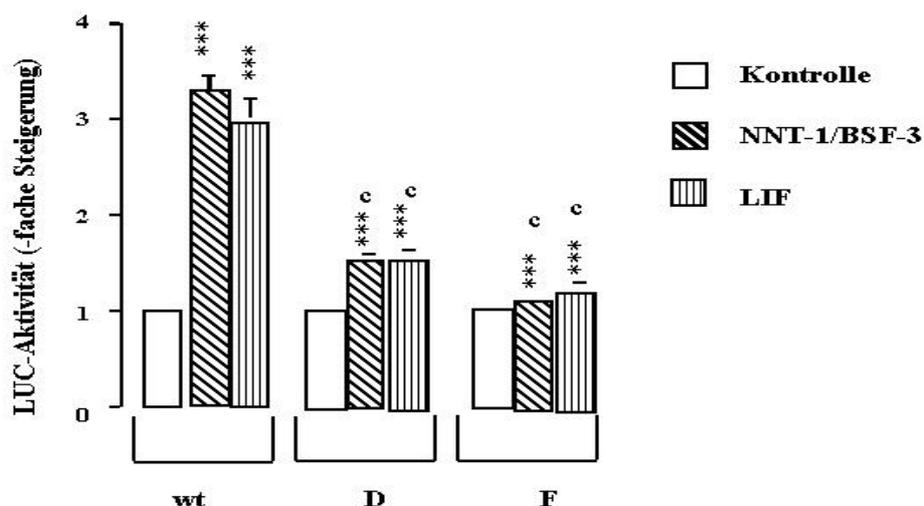
**Abb. 16. Inhibition der NNT-1/BSF-3-induzierten Aktivierung des STAT-abhängigen SOCS3-Promotors in dominant negativen STAT3-Mutanten.**

Zwei verschiedene Zellklone, bei denen Tyr705 durch Phe705 ersetzt wurde (F), zwei weitere Klone, bei denen die Stelle, die für die DNA-Bindung wichtig ist, mutiert wurde (D) und zwei Klone, die STAT3 überexprimieren (wt) wurden transient mit einem -2757 / +929 murinen SOCS3-Promotor-Luciferase-Konstrukt transfiziert. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml NNT-1/BSF-3 für 6 Std. stimuliert. Für jeden Zellklon wurde die Reporteraktivität der unstimulierten Zellen gleich 1.0 gesetzt und die Aktivität der stimulierten Zellen wurde als -fache Steigerung berechnet.

\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$

Signifikanzen bei Vergleich der Stimulationen bei D- und F-Klone zu denen bei Wt-Klonen: a<0,05, b<0,01, c<0,001

Um nachzuweisen, dass die NNT-1/BSF-3-induzierte Aktivierung des POMC-Promotors ebenfalls STAT-abhängig ist, kotransfizierten wir die STAT3F-, STAT3D- und STAT3W- Klone mit einem POMC-Promotor-Luciferase-Konstrukt. Auch hier ließ sich in den STAT3W-Mutanten die Aktivität des Promotors mittels NNT-1/BSF-3 signifikant um den Faktor  $3.3 \pm 0.2$  ( $p < 0.001$ ) steigern. Im Gegensatz dazu fiel in den STAT3D- und STAT3F-Mutanten die Stimulation der Promotoraktivität geringer aus. Es zeigte sich eine Erhöhung der Promotoraktivität bei den STAT3D-Klonen um  $1.5 \pm 0.1$  ( $p < 0.001$ ) und bei den STAT3F-Mutanten um  $1.3 \pm 0.1$  ( $p < 0.001$ ). Die Aktivierung des POMC-Promotors war also bei den STAT3D-Klonen im Vergleich zu den STAT3W-Zellen um 55% geringer ( $p < 0.001$ ) und bei den STAT3F-Mutanten um 67% ( $p < 0.001$ ). Nach LIF-Stimulation erhöhte sich in den STAT3W-Zellen die Aktivität des POMC-Promotors um den Faktor  $3.0 \pm 0.3$  ( $p < 0.001$ ). Dagegen war die Aktivierung in den STAT3D- und STAT3F-Klonen im Vergleich zu den STAT3W- Klonen geringer und zwar  $1.5 \pm 0.1$  ( $p < 0.001$ ) bzw.  $1.2 \pm 0.1$  ( $p < 0.01$ ). Die Stimulation der Promotoraktivitäten fiel demnach bei den STAT3D-Klonen um 50% ( $p < 0.001$ ) geringer aus und bei den STAT3F-Klonen um 60% ( $p < 0.001$ ) (Abb. 17).

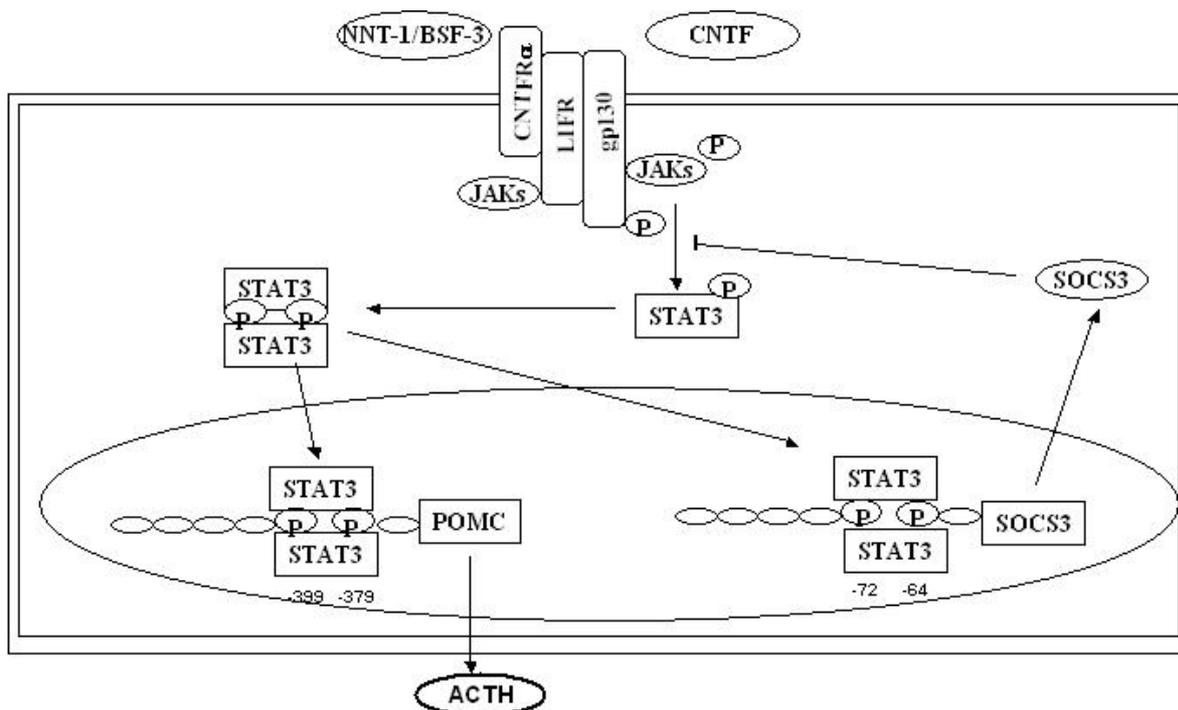


**Abb. 17. Inhibition der NNT-1/BSF-3-induzierten Aktivierung des STAT-abhängigen POMC-Promotors in dominant negativen STAT3-Mutanten.**

Zwei verschiedene Zellklone, bei denen Tyr705 durch Phe705 ersetzt wurde (F), zwei weitere Klone, bei denen die Stelle, die für die DNA-Bindung wichtig ist, mutiert wurde (D) und zwei Klone, die STAT3 überexprimieren (wt) wurden transient mit einem -706 / +64 Ratten-POMC-Promotor-Luciferase-Konstrukt transfiziert. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml NNT-1/BSF-3 für 6 Std. stimuliert. Für jeden Zellklon wurde die Reporteraktivität der unstimulierten Zellen gleich 1.0 gesetzt und die Aktivität der stimulierten Zellen wurde als -fache Steigerung berechnet. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$   
 Signifikanzen bei Vergleich der Stimulationen bei D- und F-Klone zu denen bei Wt-Klonen: a < 0,05, b < 0,01, c < 0,001

## 4. Diskussion

Wir konnten zum ersten Mal zeigen, dass das gp130-Zytokin NNT-1/BSF-3 die Jak-STAT-Kaskade in den murinen kortikotrophen Zellen AtT20 aktiviert. Durch diese Kaskade wird die STAT3-abhängige POMC-Genexpression stimuliert. Da POMC das Vorläuferprotein von ACTH ist, kommt es auf diesem Weg zur Erhöhung der ACTH-Sekretion. Die NNT-1/BSF-3-induzierte SOCS3-Genexpression ist von STAT3 abhängig. Auf diese Weise unterliegt die NNT-1/BSF-3-induzierte Aktivierung der Jak-STAT-Kaskade einer negativen Rückkopplung durch SOCS-3 (Abb. 18).



**Abb. 18. NNT-1/BSF-3 aktiviert die Jak-STAT-Kaskade.**

NNT-1/BSF-3 aktiviert durch seine Bindung an den CNTF-Rezeptor (gp130, LIFR, CNTFR $\alpha$ ) die Janus-Kinase (Jak). Diese phosphoryliert einerseits sich selber andererseits die Rezeptoruntereinheiten und die STAT-Proteine. Phosphorylierte STAT-Proteine bilden Dimere, die in den Nucleus translokieren. Dort binden sie an STAT-Bindungsstellen der DNS, wodurch die Expression verschiedener Gene induziert wird. Zum einen wird die POMC-Expression aktiviert, wodurch es zur ACTH-Sekretion kommt. Zum anderen wird SOCS3 vermehrt exprimiert, welches einen hemmenden Effekt auf die Janus-Kinase aufweist und somit die ganze Kaskade inhibiert.

Die Expression aller drei Komponenten des CNTF-Rezeptor-Komplex (CNTFR $\alpha$ , LIFR und gp130) ist für die NNT-1/BSF-3- und CNTF- induzierte Signalkaskade essentiell (45). Unsere RT-PCR-Daten zeigen, dass CNTFR $\alpha$ , LIFR und gp130 sowohl in murinen AtT-20-Zellen als auch in murinen Hypophysengeweben exprimiert werden. Diese Ergebnisse charakterisieren diese Zellen als CNTFR $\alpha$ + / LIFR+ / gp130+ (Abb. 3), was für die Sensitivität gegenüber den beiden Liganden CNTF und NNT-1/BSF-3 verantwortlich ist.

Die Wirkungen von NNT-1/BSF-3 und CNTF auf die Jak-STAT-Kaskade wurde in den murinen Hypophysenzellen AtT-20 untersucht. Da LIF ein gut charakterisierter und potenter Aktivator der Jak-STAT-Kaskade in der kortikotrophen Zelle ist, wurde LIF als positive Kontrolle verwendet (7, 8).

NNT-1/BSF-3 stimuliert die Tyrosin-Phosphorylierung von kortikotrophen STAT-3- als auch STAT-1-Proteinen (Abb. 4). Hingegen induziert CNTF nur die STAT3-Phosphorylierung. Bei beiden Zytokinen konnten wir keine Aktivierung der STAT5-Phosphorylierung feststellen. Auch zeigte sich kein Effekt auf die Tyrosinphosphorylierung der MAP-Kinasen Erk1/Erk2 (Daten nicht gezeigt), während die Sensitivität der Western Blot Analysen auf die MAP Kinasen ERK1 und ERK2 mittels einer Positivkontrolle bestätigt wurde. Ähnlich zu unseren Ergebnissen, stimuliert NNT-1/BSF-3 die STAT3- und die STAT1-Phosphorylierung in verschiedenen Neuroblastomzelllinien (74, 76, 29, 68, 45). Ebenfalls hat NNT-1/BSF-3 in diesen Zelllinien keine Wirkung auf die STAT5-Phosphorylierung (45). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen aktiviert NNT-1/BSF-3 in den Neuroblastomzelllinien die Erk1/Erk2-Phosphorylierung (45). Über eine schwache Induktion der Erk2 Tyrosinphosphorylierung durch LIF in AtT-20-Zellen wurde kürzlich berichtet (17). Jedoch ist die MAPK-Aktivität von keiner funktionalen Signifikanz in der LIF-induzierten Aktivierung der kortikotrophen Zellen (17).

Es wurde kürzlich gezeigt, dass die NNT-1/BSF-3-induzierte Signalkaskade in neuroepithelialen Zellen STAT3-abhängig ist. Dies wurde anhand von dominant negativen STAT3-Mutanten oder Mutationen im STAT-Bindungselement der Promotorregionen von spezifischen Reportergenen gezeigt (88). Funktionelle STAT-Bindungselemente wurden in den nichttranslatierten 5'-Regionen sowohl des SOCS3- (Nukleotide -72 bis -64, Genbank Accession AF117732) als auch des POMC-Gens (Nukleotide -399 bis -379, Genbank Accession X03171) charakterisiert (18, 56, 8, 6). Wir verwendeten Promotorkonstrukte von beiden Genen in Reportergenassays, um deren STAT-abhängige Aktivierung durch NNT-1/BSF-3 und CNTF zu messen. Hier zeigt sich eine durch NNT-1/BSF-3- und CNTF-vermittelte Stimulation der SOCS3- und POMC-Promotoraktivität (Abb. 6 und 8). NNT-1/BSF-3 aktiviert dabei die Promotoraktivitäten in ähnlicher Potenz wie LIF. CNTF weist hingegen eine schwächere Wirkung im Vergleich zu NNT-1/BSF-3 auf.

LIF (8, 3) und CNTF (15) aktivieren die Expression von SOCS3-Proteinen in vivo und in vitro. Eine schnelle Expression von SOCS3-mRNS nach 30 und 60 Minuten beobachtet man sowohl bei NNT-1/BSF-3, CNTF als auch bei LIF (Abb. 7). Im Gegensatz dazu findet man bei LIF und CNTF eine starke Stimulation der POMC-Genexpression nach 24 Stunden, bei NNT-1/BSF-3 hingegen nur einen schwachen, nicht-signifikanten Effekt (Abb. 9). Mit LIF läßt sich die POMC-Expression deutlich erhöhen. Das POMC-Protein ist das Vorläuferprotein von verschiedenen Proteinen. Dazu gehört auch das ACTH. Wir haben deswegen die ACTH-Sekretion mittels eines Radioimmunassays untersucht. Hier zeigt sich bei den mit NNT-1/BSF-3- und CNTF- stimulierten AtT20-Zellen eine vergleichbar starke Erhöhung der Sekretion nach 24 und 48 Stunden, während der Effekt nach Stimulation mit LIF stärker ausfiel (Abb. 10). Dieser beobachteter Unterschied zwischen POMC-Promotoraktivität, POMC-Genexpression und ACTH-Sekretion kann verschiedene Gründe haben. Erstens beinhaltet das verwendete -706/+64

Ratten POMC-Promotor-Luciferasekonstrukt nur eine begrenzte 5'-Region des POMC-Gens, während weitere positive und negative Regulationselemente der POMC-Genexpression eventuell außerhalb dieser Region lokalisiert sind. Zweitens weisen frühere Ergebnisse, welche eine LIF-induzierte POMC-mRNS-Expression zwischen einer und 24 Stunden nachweisen, auf einen möglichen Höhepunkt nach 24 Stunden hin (17). Aus diesem Grund wurde in dieser Studie nur die Expression der POMC-mRNS nach 24-Stunden untersucht, wohingegen das Maximum der NNT-1/BSF-3-induzierten Expression möglicherweise zu einem anderen Zeitpunkt zu erwarten ist.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass NNT-1/BSF-3 und CNTF in der Lage sind, die Jak-STAT-Kaskade und somit die STAT-abhängigen Genexpressionen von SOCS3 und POMC in murinen Hypophysenzellen zu stimulieren. Als Folge der Induktion des POMC-Gens kommt es zu einer Steigerung der ACTH-Sekretion. In Hypophysenzellen erfolgt sowohl bei NNT-1/BSF-3 als auch bei CNTF die Signaltransduktion über den dreiteiligen CNTF-Rezeptorkomplex (29, 68, 45). Unsere Daten weisen daraufhin, dass der CNTF-Rezeptorkomplex eine funktionelle Rolle in der Stimulation der Hypophyse dieser Zytokine ausübt.

In der nächsten Versuchsreihe haben wir untersucht, ob die NNT-1/BSF-3-induzierte Signalkaskade durch SOCS3 reguliert wird. SOCS3 wird sowohl in Hypothalamus- als auch in Hypophysengewebe exprimiert. Hier hemmt es die Jak-STAT-Kaskade, die von einer Vielzahl von Zytokinen aktiviert wird. Dies ist eine von mehreren bekannten Möglichkeiten der Regulation der neuro-immunoendokrinen Regelkreise (8, 6). Dieser hemmende Effekt von SOCS3 auf die Jak-STAT-Kaskade wurde ebenfalls bei verschiedenen gp130-Zytokinen, wie LIF und CNTF, beobachtet (8, 15, 6). SOCS3 inhibiert die Janus-Kinase, wodurch die Tyrosinphosphorylierung der STAT-Proteine gehemmt wird. Dies hat zur Folge, dass die Aktivierung der STAT-abhängigen Genexpressionen, z.B. von POMC und auch von SOCS3 selber, unterbrochen wird.

Um die Wirkung von SOCS3 auf die von NNT-1/BSF-3-vermittelte Signalinduktion zu untersuchen, verwendeten wir in unserer Studie AtT-20-Zellen, die SOCS3 überexprimierten (AtT20-S). Dadurch zeigte sich, daß SOCS3 ebenfalls einen inhibierenden Effekt auf die NNT-1/BSF-3-induzierte Jak-STAT-Kaskade hat.

Durch die Überexpression von SOCS3 wird die NNT-1/BSF-3-induzierte Phosphorylierung sowohl der STAT3- als auch der STAT1-Proteine gehemmt (Abb. 11). Als Folge davon zeigte sich eine Abnahme der STAT-abhängigen Aktivierung der Promotorregionen sowohl von SOCS3 als auch von POMC (Abb. 12 und 13). Ebenfalls zeigte sich in Northern Blot Analysen die SOCS3-vermittelte Hemmung der Genexpressionen von SOCS3 (Abb. 14). Dies führte wiederum zu einer signifikanten Abnahme der ACTH-Sekretion (Abb. 15). Diese Ergebnisse zeigen, dass die durch NNT-1/BSF-3-induzierte Jak-STAT-Kaskade einer negativen Rückkopplung unterliegt, die über SOCS3 vermittelt wird. Dabei hemmt SOCS3 ebenfalls seine eigene Expression, so dass eine Autoregulation vorliegt.

Da bereits die basale ACTH-Sekretion der AtT20-S-Zellen geringer ausfiel als die der AtT20-M-Zellen (Kontrollzellen), weist dies auf eine mögliche Inhibition der basalen ACTH-Sekretion durch eine autokrine Sekretion der gp130-Zytokine.

Um die Bedeutung von STAT3 in der NNT-1/BSF-3-induzierten Signalkaskade zu untersuchen, haben wir dominant negative STAT3-Mutanten verwendet. Dies waren zum einem Mutanten, bei denen die Aminosäure Tyrosin<sup>705</sup> gegen Phenylalanin<sup>705</sup> ausgetauscht wurde, wodurch die Tyrosinphosphorylierung gestört ist (STAT3F), zum anderen Mutanten, die an der Stelle eine Veränderung aufweisen, die für die DNS-Bindung wichtig ist (STAT3D) (58). Als Kontrollzellen verwendeten wir Zellen, die STAT3 stabil überexprimierten (STAT3W) (17).

Entsprechend den Mutationen zeigte sich in Western Blot Analysen bei den STAT3F-Klonen keine Erhöhung der STAT-Phosphorylierung, jedoch bei den

STAT3D- sowie STAT3W-Klonen (Abb. 17). Dies deutet darauf hin, dass NNT-1/BSF-3 die Phosphorylierung der STAT3-Proteine am Tyrosinrest Tyr<sup>705</sup> stimuliert.

Bei den Promotorstudien fiel die NNT-1/BSF-3-induzierte Aktivierung sowohl des POMC- als auch des SOCS-Promotors bei den dominant negativen Mutanten signifikant geringer aus als bei den Kontrollzellen (Abb. 18 und 19). Dies ist bei den STAT3F-Mutanten Folge der verminderten Phosphorylierung der STAT3-Proteine. Durch diese fehlende Aktivierung, wird die Jak-STAT-Signalkaskade nicht stimuliert und somit auch nicht die Promotorregionen. Hingegen war die NNT-1/BSF-3-induzierte Phosphorylierung und damit die Aktivierung der STAT-Proteine bei den STAT3D-Mutanten nicht vermindert. Jedoch kam es aufgrund der mutierten DNS-Bindungsstelle nicht zur Bindung der STAT-Proteine an die DNS und nachfolgend nicht zur Aktivierung der Promotorregionen.

## 5. Zusammenfassung

Wir haben gezeigt, dass das neue gp130-Zytokin NNT-1/BSF-3 ein potenter Modulator der kortikotropen Funktion ist. Es stimuliert in murinen kortikotropen AtT20-Zellen die Jak-STAT-Kaskade, die STAT-abhängige SOCS3- und POMC-Genexpression sowie die ACTH-Sekretion. Ähnliche Effekte ergaben sich auch bei Stimulation mit CNTF. Weiterhin zeigte sich, dass die NNT-1/BSF-3-induzierte Signalkaskade durch SOCS3 negativ reguliert wird.

Während CNTF nicht aktiv von Zellen sezerniert wird, aber passiv nach Schädigung der Zelle freigesetzt wird (45, 67), kann NNT-1/BSF-3 von Zellen als ein Heterokomplex zusammen mit CLF oder CNTFR $\alpha$  sezerniert werden (29, 68).

Es zeigte sich eine induzierbare Expression von NNT-1/BSF-3 mRNA in der murinen hypophysären follikulostellaren Zelllinie TtT/GF (90). Diese Induktion ließ sich durch cAMP, PMA und PACAP hervorrufen (9). NNT-1/BSF-3 ist somit ein neuer parakriner neuroimmunoendokriner Modulator der Hypophysen – Nebennierenrinden - Achse.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Adams T.E., Hansen J.A., Starr R., Nicola N.A., Hilton D.J., Billestrup N., 1998. Growth hormone preferentially induces the rapid, transient expression of SOCS-3, a novel inhibitor of cytokine receptor signaling. *J Biol Chem*, 273 (3): 1285-7
2. Arzt E., Pereda M.P., Castro C.P., Pagotto U., Renner U., Stalla G.K., 1999. Pathophysiological role of the cytokine network in the anterior pituitary gland. *Front Neuroendocrinol*, 20 (1): 71-95
3. Auernhammer C.J., Chesnokova V., Bousquet C., Melmed S., 1998. Pituitary corticotroph SOCS-3: novel intracellular regulation of leukemia-inhibitory factor-mediated proopiomelanocortin gene expression and adrenocorticotropin secretion. *Mol Endocrinol*, 12 (7): 954-61
4. Auernhammer C.J., Melmed S., 1999. Interleukin-11 stimulates proopiomelanocortin gene expression and adrenocorticotropin secretion in corticotroph cells: evidence for a redundant cytokine network in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*, 140 (4): 1559-66
5. Auernhammer C.J., Bousquet C., Melmed S., 1999. Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (12): 6964-9
6. Auernhammer C.J., Bousquet C., Chesnokova V., Melmed S., 2000. SOCS proteins: modulators of neuroimmunoendocrine functions. Impact on corticotroph LIF signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 917: 658-64

7. Auernhammer C.J., Melmed S., 2000. Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function. *Endocrine Reviews*, 21 (3): 313- 345
8. Auernhammer C.J., Melmed S., 2001. The central role of SOCS-3 in integrating the neuro-immunoendocrine interface. *J Clin Invest*, 108 (12): 1735-40
9. Auernhammer C.J., Vlotides G., Hengge S., Engelhardt D., Stalla G.K., 2003. Regulated expression of the novel neurotrophin-1/B-cell stimulating factor-3 (Cardiotrophin-like cytokine) in pituitary folliculostellate TtT/GF cells- Expression of NNT-1/BSF-3 in pituitary folliculostellate cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 111: S21
10. Barton V.A., Hudson K.R., Heath J.K., 1999. Identification of three distinct receptor binding sites of murine interleukin-11. *J Biol Chem*, 274 (49): 5755-61
11. Bazan J.F., 1990. Haematopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol. Today* 11 (10):350-54
12. Bazan J.F., 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (18):6934-38
13. Bilezikjian L.M., Turnbull A.V., Corrigan A.Z., Blount A.L., Rivier C.L., Vale W.W., 1998. Interleukin-1beta regulates pituitary follistatin and inhibin/activin betaB mRNA levels and attenuates FSH secretion in response to activin-A. *Endocrinology*, 139 (7): 3361-4

14. Bjorbaek C, Elmquist J.K, Frantz J.D., Shoelson S.E., Flier J.S., 1998. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance Mol Cell, 1 (4): 619-25
15. Bjorbaek C., Elmquist J.K., El-Haschimi K., Kelly J., Ahima R.S., Hileman S., Flier J.S., 1999. Activation of SOCS-3 messenger ribonucleic acid in the hypothalamus by ciliary neurotrophic factor. Endocrinology, 140 (5): 2035-43
16. Boulanger M.J., Chow D.-c., Brevnova E., Garcia K.C., 2003. Hexameric structure and assembly of the Interleukin-6/IL-6  $\alpha$ -Receptor/gp130 complex. Science 300 (5628):2101-04
17. Bousquet C, Melmed S., 1999. Critical role for STAT3 in murine pituitary adrenocorticotropin hormone leukemia inhibitory factor signaling. J Biol Chem, 274 (16): 10723-30
18. Bousquet C., Zatelli M.C., Melmed S., 2000. Direct regulation of pituitary proopiomelanocortin by STAT3 provides a novel mechanism for immuno-neuroendocrine interfacing. J Clin Invest, 106 (11): 1417-25
19. Carter-Su C., Smit L.S., 1998. Signaling via JAK tyrosine kinases: growth hormone receptor as a model system. Recent Prog Horm Res, 53: 61-82
20. Chung C.D., Liao J., Liu B., Rao X., Jay P., Berta P., Shuai K., 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. Science, 278 (5344): 1803-5

21. Dahmen H., Horsten U., Kuster A., Jacques Y., Minvielle S., Kerr I.M., Ciliberto G., Paonessa G., Heinrich P.C., Muller-Newen G., 1998. Activation of the signal transducer gp 130 by interleukin-11 and interleukin-6 is mediated by similar molecular interactions. *Biochem J*, 331 (Pt3): 695-702
22. Darnell J.E., Jr, Kerr I.M., Stark G.R., 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264 (5164):1415-21
23. Darnell J.E., Jr., 1997. STATs and gene regulation. *Science*, 277 (5332): 1630-5
24. Davis S., Aldrich T.H., Valenzuela D.M., Wong V.V., Furth M.E., Squinto S.P., Yancopoulos G.D., 1991. The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science*, 253 (5015): 59-63
25. Davis S., Aldrich T.H., Stahl N., Pan L., Taga T., Kishimoto T., Ip N.Y., Yancopoulos G.D., 1993. LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science*, 260 (5115): 1805-8
26. De Souza D., Fabri L.J., Nash A., Hilton D.J., Nicola N.A., Baca M., 2002. SH2 domains from suppressor of cytokine signaling-3 and protein tyrosine phosphatase SHP-2 have similar binding specificities. *Biochem.* 41 (29):9229-36

27. Di Marco A., Gloaguen I., Graziani R., Paonessa G., Saggio I., Hudson K.R., Laufer R., 1996. Identification of ciliary neurotrophic factor (CNTF) residues essential for leukemia inhibitory factor receptor binding and generation of CNTF receptor antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (17): 9247-52
28. Elson G.C, Graber P., Losberger C., Herren S., Gretener D., Menoud L.N., Wells T.N., Kosco-Vilbois M.H., Gauchat J.F., 1998. Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family. *J Immunol*, 161 (3): 1371-9
29. Elson G.C., Lelievre E., Guillet C., Chevalier S., Plun-Favreau H., Froger J., Suard I., de Coignac A.B., Delneste Y., Bonnefoy J.Y., Gauchat J.F.Gascan H., 2000. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci*, 3 (9): 867-72
30. Endo T.A., Masuhara M., Yokouchi M., Suzuki R., Sakamoto H., Mitsui K., Matsumoto A., Tanimura S., Ohtsubo M., Misawa H., Miyazaki T., Leonor N., Taniguchi T., Fujita T., Kanakura Y., Komiya S., Yoshimura A., 1997. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, 387 (6636): 921-4
31. Frantsve J., Schwaller J., Sternberg D.W., Kutok J., Gilliland D.G., 2001. Socs-1 inhibits TEL-JAK2-mediated transformation of hematopoietic cells through inhibition of JAK2 kinase activity and induction of proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell. Biol.* 21 (10):3547-57

32. Gearing D.P., Thut C.J., VandeBos T., Gimpel S.D., Delaney P.B., King J., Price V., Cosman D., Beckmann M.P., 1991. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J*, 10 (10): 2839-48
33. Gearing D.P., Comeau M.R., Friend D.J., Gimpel S.D., Thut C.J., McGourty J., Brasher K.K., King J.A., Gillis S., Mosley B., 1992. The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science*, 255 (5050):1434-7
34. Gearing D.P., 1993. The leukemia inhibitory factor and its receptor. *Adv Immunol*, 53: 31-58
35. Helman D, Sandowski Y., Cohen Y., Matsumoto A., Yoshimura A., Merchav S, Gertler A., 1998. Cytokine-inducible SH2 protein (CIS3) and JAK2 binding protein (JAB) abolish prolactin receptor-mediated STAT5 signaling. *FEBS Lett*, 441 (2): 287-91
36. Hibi M., Murakami M., Saito M., Hirano T., Taga T., Kishimoto T., 1990. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, 63 (6): 1149-57
37. Hibi M., Nakajima K., Hirano T., 1996. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med*, 74 (1): 1-12
38. Hilton D.J., Richardson R.T., Alexander W.S., Viney E.M., Willson T.A., Sprigg N.S., Starr R., Nicholson S.E., Metcalf D., Nicola N.A., 1998. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (1): 114-9

39. Horvath C.M., Darnell J.E., 1997. The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr Opin Cell Biol*, 9 (2): 233-9
40. Hudson K.R. Vernallis A.B., Heath J.K., 1996. Characterization of the receptor binding sites of human leukemia inhibitory factor and creation of antagonists. *J Biol Chem*, 271 (20): 11971-8
41. Ihle J.N., Kerr I., 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet*. 11 (2):69-74
42. Johnston J.A., Bacon C.M., Riedy M.C., O'Shea J.J., 1996. Signaling by IL-2 and related cytokines: JAKs, STATs, and relationship to immunodeficiency. *J Leukoc Biol*, 60 (4): 441-52
43. Kile B.T., Schulman B.A., Alexander W.S., Nicola N.A., Martin H.M., Hilton D.J., 2002. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. Review. *Trends Biochem. Sci*. 27 (5):235-41
44. Lamb P., Seidel H.M, Haslam J., Milocco L., Kessler L.V., Stein R.B., Rosen J., 1995. STAT protein complexes activated by interferon-gamma and gp130 signaling molecules differ in their sequence preferences and transcriptional induction properties. *Nucleic Acids Res*, 23 (16): 3283-9
45. Lelievre E., Plun-Favreau H., Chevalier S., Froger J., Guillet C., Elson G. C., Gauchat J.F., Gascan H., 2001. Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 composite cytokine: specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor alpha component. *J Biol Chem*, 276 (25): 22476-84

46. Liu B., Liao J., Rao X., Kushner S.A., Chung C.D., Chang D.D., Shuai K., 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (18): 10626-31
47. Luttkicken C., Wegenka U.M., Yuan J., Buschmann J., Schindler C., Ziemiecki A., Harpur A.G., Wilks A.F., Yasukawa K., Taga T., 1994. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science*, 263 (5143): 89-92
48. Masuhara M., Sakamoto H., Matsumoto A., Suzuki R., Yasukawa H., Mitsui K., Wakioka T., Tanimura S., Sasaki A., Misawa H., Yokouchi M., Ohtsubo M., Yoshimura A., 1997. Cloning and characterization of novel CIS family genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 239 (2): 439-46
49. McDonald N.Q., Panayotatos N., Hendrickson W.A., 1995. Crystal structure of dimeric human ciliary neurotrophic factor determined by MAD phasing. *EMBO J*, 14 (12): 2689-99
50. Megeney L.A., Perry R.L., LeCouter J.E., Rudnicki M.A., 1996. bFGF and LIF signaling activates STAT3 in proliferating myoblasts. *Dev Genet*, 19 (2): 139-45
51. Melmed S., 1997. Gp130-related Cytokines and their receptors in the Pituitary. *Trends Endocrinol. Metab.*, 8 (10): 391-397
52. Menziani M.C., Fanelli F., De Benedetti P.G., 1997. Theoretical investigation of IL-6 multiprotein receptor assembly. *Proteins*, 29 (4): 528-544

53. Minamoto S., Ikegame K., Ueno K., Narazaki M., Naka T., Yamamoto H., Matsumoto T., Saito H., Hosoe S., Kishimoto T., 1997. Cloning and functional analysis of new members of STAT induced STAT inhibitor (SSI) family: SSI-2 and SSI-3. *Biochem Biophys Res Commun*, 237 (1): 79-83
54. Moutoussamy S., Kelly P.A., Finidori J., 1998. Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signaling. *Eur J Biochem*, 255 (1): 1-11
55. Murakami M., Hibi M., Nakagawa N., Nakagawa T., Yasukawa K., Yamanishi K., Taga T, Kishimoto T., 1993. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science*, 260 (5115): 1808-10
56. Mynard V., Guignat L., Devin-Leclerc J., Bertagna X., Catelli M.G., 2002. Different mechanisms for leukemia inhibitory factor- dependent activation of two proopiomelanocortin promoter region. *Endocrinology*, 143 (10): 3916-3924
57. Naka T., Narazaki M., Hirata M., Matsumoto T., Minamoto S., Aono A., Nishimoto N., Kajita T., Taga T., Yoshizaki K., Akira S., Kishimoto T., 1997. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 387 (6636): 924-9
58. Nakajima K., Yamanaka Y., Nakae K., Kojima H., Ichiba M., Kiuchi N., Kitaoka T., Fukada T., Hibi M., Hirano T., 1996. A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells. *EMBO J*, 15 (14): 3651-8

59. Nakashima K., Taga T., 1998. Gp130 and the IL-6 family of cytokines: signaling mechanisms and thrombopoietic activities. *Semin Hematol*, 35 (3): 210-21
60. Nicholson S.E., Willson T.A., Farley A., Starr R., Zhang J.G., Baca M., Alexander W.S., Metcalf D., Hilton D.J., Nicola N.A., 1999. Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *EMBO J*, 18 (2): 375-85
61. 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., 2000. Suppressor of cytokine signalling-3 preferentially binds to SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (12):6493-98
62. Ohya K., Kajigaya S., Yamashita Y., Miyazato A., Hatake K., Miura Y., Ikeda U., Shimada K., Ozawa K., Mano H., 1997. SOCS-1/JAB/SSI-1 can bind to and suppress Tec protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 272 (43): 27178-82
63. Panayotatos N., Radziejewska E., Acheson A., Somogyi R., Thadani A., Hendrickson W.A., McDonald N.Q., 1995. Localization of functional receptor epitopes on the structure of ciliary neurotrophic factor indicates a conserved, function-related epitope topography among helical cytokines. *J Biol Chem*, 270 (23): 14007-14

64. Paonessa G., Graziani R., De Serio A., Savino R., Ciapponi L., Lahm A., Salvati A.L., Toniatti C., Ciliberto G., 1995. Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling. *EMBO J*, 14 (9): 1942-1951
65. Pennica D., Shaw K.J., Swanson T.A., Moore M.W., Shelton D.L., Zioncheck K.A., Rosenthal A., Taga T., Paoni N.F., Wood W. I., 1995. Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *J Biol Chem*, 270 (18): 10915-22
66. Pennica D., Wood W.I., Chien K.R., 1996. Cardiotrophin-1: a multifunctional cytokine that signals via LIF receptor-gp130 dependent pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7 (1):81-91
67. Perez Castro C., Carbia Nagashima A., Paez Pereda M., Goldberg V., Chervin A., Carrizo G., Molina H., Renner U., Stalla G.K., Arzt E., 2001. Effects of the gp130 cytokines ciliary neurotrophic factor (CNTF) and interleukin-11 on pituitary cells: CNTF receptors on human pituitary adenomas and stimulation of prolactin and GH secretion in normal rat anterior pituitary aggregate cultures. *J Endocrinol*, 169 (3):539-47
68. Plun-Favreau H., Elson G., Chabbert M., Froger J., deLapeyriere O., Lelievre E., Guillet C., Hermann J., Gauchat J. F., Gascan H., Chevalier S., 2001. The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin- like cytokine. *EMBO J*, 20 (7): 1692-703

69. Robledo O., Fourcin M., Chevalier S., Guillet C., Auguste P., Pouplard-Barthelaix A., Pennica D., Gascan H., 1997. Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component. *J Biol Chem*, 272 (8): 4855-63
70. Sakamoto H., Yasukawa H., Masuhara M., Tanimura S., Sasaki A., Yuge K., Ohtsubo M., Ohtsuka A., Fujita T., Ohta T., Furukawa Y., Iwase S., Yamada H., Yoshimura A., 1998. A Janus kinase inhibitor, JAB, is an interferon-gamma-inducible gene and confers resistance to interferons. *Blood*, 92 (5): 1668-76
71. Sasaki A., Yasukawa H., Suzuki A., Kamizono S., Syoda T., Kinjyo I., Sasaki M., Johnston J.A., Yoshimura A., 1999. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Hanus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells* 4 (6):339-351
72. Sasaki A., Yasukawa H., Shouda T., Kitamura T., Dikic I., Yoshimura A., 2000. CIS3/SOCS3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J. Biol. Chem.* 275 (38):29338-47
73. Schiemann W.P., Graves L.M., Baumann H., Morella K.K., Gearing D.P., Nielsen M.D., Krebs E.G., Nathanson N.M., 1995. Phosphorylation of the human leukemia inhibitory factor (LIF) receptor by mitogen-activated protein kinase and the regulation of LIF receptor function by heterologous receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (12): 5361-5

74. Senaldi G., Varnum B.C., Sarmiento U., Starnes C., Lile J., Scully S., Guo J., Elliott G., McNinch J., Shaklee C.L., Freeman D., Manu F., Simonet W.S., Boone T., Chang M.S., 1999. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL- 6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (20): 11458-63
75. Servidei T., Aoki Y., Lewis S.E., Symes A., Fink J. S., Reeves S.A., 1998. Coordinate regulation of STAT signaling and c-fos expression by the tyrosine phosphatase SHP-2. *J Biol Chem*, 273 (11): 6233-41
76. Shi Y., Wang W., Yourey P.A., Gohari S., Zukauskas D., Zhang J., Ruben S., Alderson R.F., 1999. Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem Biophys Res Commun*, 262 (1): 132-8
77. Simpson R.J., Hammacher A., Smith D.K., Matthews J.M., Ward L.D., 1997. Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci*, 6 (5): 929-55
78. Somers W., Stahl M., Seehra J.S., 1997. 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J*, 16 (5): 989-997
79. Song M.M., Shuai K., 1998. The suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem* 273 (52): 35056-62

80. Stahl N., Boulton T.G., Farruggella T., Ip N.Y., Davis S., Witthuhn B.A., Quelle F.W., Silvennoinen O., Barbieri G., Pellegrini S., 1994. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science*, 263 (5143): 92-5
81. Starr R., Willson T.A., Viney E.M., Murray L.J., Rayner J.R., Jenkins B.J., Gonda T.J., Alexander W.S., Metcalf D., Nicola N.A., Hilton D.J., 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 387 (6636): 917-21
82. Stofega M.R., Wang H., Ullrich A., Carter-Su C., 1998. Growth hormone regulation of SIRP and SHP-2 tyrosyl phosphorylation and association. *J Biol Chem*, 273 (12): 7112-7
83. Suzuki R., Sakamoto H., Yasukawa H., Masuhara M., Wakioka T., Sasaki A., Yuge K., Komiya S., Inoue A., Yoshimura A., 1998. CIS3 and JAB have different regulatory roles in interleukin-6 mediated differentiation and STAT3 activation in M1 leukemia cells. *Oncogene*, 17 (17): 2271-8
84. Symes A., Stahl N., Reeves S.A., Farruggella T., Servidei T., Gearan T., Yancopoulos G., Fink J.S., 1997. The protein tyrosine phosphatase SHP-2 negatively regulates ciliary neurotrophic factor induction of gene expression. *Curr Biol*, 7 (9): 697-700
85. Taga T., Kishimoto T., 1990. Immune and hematopoietic cell regulation: cytokines and their receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2 (2):174-80
86. Taga T., 1996. Gp130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines. *J. Neurochem.* 67 (1):1-10

87. Taga T., Kishimoto T., 1997. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol*, 15 : 797-819
88. Uemura A., Takizawa T., Ochiai W., Yanagisawa M., Nakashima K., Taga T., 2002. Cardiotrophin-like-cytokine induces astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine* 18 (1): 1-7
89. Ungureanu D., Saharinen P., Junttila I., Hilton D.J., Silvennoinen O., 2002. Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol. Cell. Biol.* 22 (10):3316-26
90. Vlotides G., Zitzmann K., Hengge S., Engelhardt D., Stalla G.K., Auernhammer C.J., 2003. Expression of novel neurotrophin-1/B-cell stimulating factor (NNT-1/BSF-3) in murine pituitary folliculostellate TtT/GF cells: differential regulation by PACAP-38 and dexamethasone. (eingereicht).
91. Walter M.R., 1997. Structural biology of cytokines, their receptors, and signaling complexes: implications for the immune and neuroendocrine circuit. *Chem Immunol*, 69: 76-98
92. Yasukawa H, Misawa H., Sakamoto H., Masuhara M., Sasaki A., Wakioka T., Ohtsuka S., Imaizumi T., Matsuda T., Ihle J.N., Yoshimura A., 1999. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J*, 18 (5): 1309-20

93. Yoshimura, A., Ohkubo, T., Kiguchi, T., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Hara, T., Miyajima, A., 1995. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J*, 14 (12): 2816-26

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht bzw. von mir als Vortrag vorgestellt in:

1. Auernhammer C.J.\* , Isele N.B.\* , Kopp F.B., Spöttl G., Cengic N., Weber M.M., Senaldi G., Engelhardt D., 2003. Novel Neurotrophin-1/B Cell-Stimulating Factor-3 (Cardiotrophin-Like Cytokine) stimulates corticotroph function via a Signal Transducer and Activator of Transcription-dependent Mechanism negatively regulated by Suppressor of Cytokine Signaling-3. *Endocrinology*, 144(4): 1202-10  
\* beide Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei
2. Auernhammer C.J., Kopp F.B., Vlotides G., Dorn F., Isele N.B., Spöttl G., Cengic N., Weber M.M., Senaldi G., Engelhardt D.. Comparative study of gp130 cytokine effects on corticotroph AtT-20 cells - redundancy or specificity of neuroimmunoendocrine modulators?  
*Neuroimmunomodulation* (in Druck)
3. Auernhammer C.J., Isele N.B., Weber M.M., Senaldi G., Engelhardt D., 2002. The novel gp130 cytokine NNT-1/BSF-3 stimulates corticotroph function by a STAT-dependent pathway. 46th Symposium DGE - Exp Clin Endocrinol Metab; 110(Suppl1):S14.
4. Auernhammer C.J., Kopp F.B., Isele N.B., Dorn F., Weber M.M., Senaldi G., Engelhardt D., 2002. Murine corticotroph AtT-20 cells are primarily stimulated by ligands of the LIFR/gp130 and CNTFR/LIFR/gp130 complex – a comparative study of gp130 cytokine action on corticotrophs. 10th Meeting of the European Neuroendocrine Association

5. Kolloquium endokrinologischer Methoden, Medizinische Klinik des Klinikums Innenstadt der Ludwig-Maximilian-Universität München, 2001. Novel Neurotrophin-1/B-cell stimulating Factor-3 (NNT-1/BSF-3) stimulates corticotrophe function via a STAT dependent signaling cascade
  
6. DGE Junge Forschung aktiv, 4. Perspektivenkonferenz, 2002. Novel Neurotrophin-1/B-cell stimulating Factor-3 (NNT-1/BSF-3) stimulates corticotrophe function via a STAT dependent signaling cascade

Mein Dank gilt:

Herrn Professor Dr. med. D. Engelhardt für die Überlassung des Themas sowie für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in der Neuroendokrino-logischen Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik II des Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilian-Universität.

Herrn Dr. med. C. Auernhammer für die Betreuung der Doktorarbeit und Unterstützung der Planung und Durchführung der Experimente.

Herrn F. Kopp und Herrn G. Spöttl für die technische Hilfestellung.

Den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung.

Meinem Freund M. Christopeit für seinen Rückhalt und anregenden Diskussionen.

Meinen Eltern.

Diese Arbeit ist selbständig und ohne Zuhilfenahme anderer als der angegebenen Hilfsmittel entstanden. Alle der Literatur entnommenen Erkenntnisse sind als solche kenntlich gemacht und ihrer Herkunft entsprechend einzeln nachgewiesen.

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name: Nicola Berrit Isele  
Geburtstag: 05.09.1976  
Geburtsort: Mannheim  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

August 1983- Juli 1987	Grundschule, Bensheim
August 1987- Juli 1989	Maria-Ward-Gymnasium, Bensheim
September 1989- August 1994	Gymnasium am Anger, München
September 1994- Juli 1996	Nymphenburg-Gymnasium, München, Abitur

## Ausbildung

November 1996	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
September 1998	Physikum
August 1999	1. Staatsexamen
März 2002	2. Staatsexamen

## Famulaturen

März 1999- April 1999	Allgemeinchirurgie, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, München
September 1999- Oktober 1999	Innere Medizin, Dr. Peter Lehmann, Gräfelfing
März 2000- April 2000	Endokrinologie, The Canberra Hospital, Australien
September 2000- Oktober 2000	Neurologie, The National Hospital for Neurology and Neurosurgery, UCL, London, UK

## Praktisches Jahr

April 2002- Juni 2002	Innere Medizin, Medizinische Poliklinik München
Juni 2002- August 2002	Innere Medizin, Medizinische Klinik II, Klinikum Großhadern
August 2002- November 2002	Neurologie, Neurologische Klinik, Klinikum Großhadern
November 2002- Januar 2003	Chirurgie, Chirurgische Klinik, Klinikum Großhadern
Januar 2003- Februar 2003	Neurochirurgie, Neurochirurgische Klinik, Klinikum Großhadern

April 2003	3. Staatsexamen
------------	-----------------

Seit Juni 2003	Ärztin im Praktikum in der Neurologische Klinik, Klinikum Großhadern
----------------	--