

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK UND POLIKLINIK II -
GROSSHADERN DER LUDWIG-MAXIMILIANS- UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. MED. B. GÖKE

**Modulation der Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
und Induktion von Apoptose an der adrenocorticalen
Tumorzelle durch Oncostatin M**

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

vorgelegt von
Franziska Dorn
aus München

2005

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. K. G. Parhofer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. E. Uhl
Prof. Dr. med. R. Gärtner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. C. J. Auernhammer

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2005

Diese Arbeit ist selbstständig 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.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S. 1
1.1. Modulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse	S. 1
1.2. gp130-Zytokine	S. 3
1.3. Signaltransduktion der gp130-Zytokine	S.6
1.3.1. Jak-STAT-Signalkaskade	S.6
1.3.2. MAPK-Signalweg	S.8
1.4. Limitierung der Zytokinwirkung	S.10
1.4.1. SOCS-Proteine	S.10
1.4.2. PIAS	S.12
1.4.3. Protein-Tyrosin-Phosphatasen	S.12
1.5. Oncostatin M	S.14
1.6. Apoptose: programmierter Zelltod	S.16
1.7. Fragestellung und Zielsetzung	S.17
2. Materialien und Methoden	S.18
2.1. Materialien	S.18
2.1.1. Zellkultur	S.18
2.1.2. Stimulationsversuche	S.19
2.1.3. RT-PCR	S.20
2.1.4. Westernblot	S.21
2.1.5. Luciferase-Assay	S.23
2.1.6. Radioimmunassay	S.24
2.1.7. Proliferationsassay	S.25

2.2. Methoden	S.26
2.2.1. Zellkultur	S.26
2.2.2. RT-PCR	S.27
2.2.3. Westernblot	S.31
2.2.4. Luciferase-Assay	S.34
2.2.5. ACTH-Radioimmunassay	S.36
2.2.6. Corticosteron-Radioimmunassay	S.37
2.2.7. Proliferationsassay	S.39
2.2.8. Statistik	S.41
3. Ergebnisse	S.42
3.1. Effekte von Oncostatin M an corticotrophen AtT-20 Zellen	S.42
3.1.1. Expression der funktionellen Rezeptoruntereinheiten gp130, LIFR und OSMR in corticotrophen AtT-20 Zellen und murinem Hypophysengewebe	S.42
3.1.2. Tyrosinphosphorylierung von STAT-3 und STAT-1 in corticotrophen AtT-20 Zellen durch mLIF, mOSM und hOSM	S.44
3.1.3. SOCS-3 Genexpression in corticotrophen AtT-20 Zellen durch mLIF, mOSM und hOSM	S.45
3.1.4. POMC Genexpression in corticotrophen AtT-20 Zellen durch mLIF, mOSM und hOSM	S.46
3.1.5. ACTH-Sekretion corticotropher AtT-20 Zellen durch mLIF, mOSM und hOSM	S.47
3.2. Effekte von Oncostatin M an adrenocorticalen Y-1 Zellen	S.48
3.2.1. Expression der funktionellen Rezeptoruntereinheiten gp130, LIFR und OSMR in adrenocorticalen Y-1 Zellen und murinem Nebennierengewebe	S.48

3.2.2.	Tyrosinphosphorylierung von STAT-3 und STAT-1 in adrenocorticalen Y-1 Zellen durch mLIF, mOSM und hOSM	S.49
3.2.3.	SOCS-3 Genexpression in adrenocorticalen Y-1 Zellen durch mLIF, mOSM und hOSM	S.50
3.2.4.	Steroidsekretion adrenocorticaler Y-1 Zellen durch mLIF, mOSM und hOSM	S.51
3.2.5.	Wirkung von mOSM auf die Morphologie und Anzahl vitaler adrenocorticaler Y-1 Zellen	S.53
3.2.5.1.	Morphologische Veränderungen adrenocorticaler Y-1 Zellen durch mOSM	S.54
3.2.5.2.	Negativer Effekt von mOSM auf die Zahl vitaler adrenocorticaler Y-1 Zellen	S.56
3.2.6.	Nachweis von Apoptose-Markern in adrenocorticalen Y-1 Zellen nach Stimulation mit mOSM	S.61
3.2.6.1.	Nachweis aktivierter Caspase-3	S.61
3.2.6.2.	Nachweis inaktivierter PARP	S.63
4.	Diskussion	S.64
4.1.	Unterschiedliche Effekte von murinem und humanem OSM an der corticotrophen Zelle	S.64
4.2.	Effekte von OSM an der adrenocorticalen Zelle	S.68
5.	Zusammenfassung	S.73
6.	Literaturverzeichnis	S.74
7.	Lebenslauf	S.84
8.	Danksagung	S.85

1. Einleitung

1.1. Modulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Ein komplexes System neuroendokriner und immunologischer Faktoren garantiert eine adäquate Reaktion des Organismus auf jede Störung seines Gleichgewichts durch Stress, inflammatorisches oder infektiöses Geschehen. Die Basis dieser Prozesse stellen eine Vielzahl regulatorischer Moleküle wie Hormone, Neurotransmitter und Zytokine dar.

Die Aktivierung der Hypothalamus–Hypophysen–Nebennierenrinden–Achse (engl. hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis, im Folgenden HPA–Achse) ist dabei unter physiologischen Bedingungen von zentraler Bedeutung. Sie unterliegt in erster Linie dem im zirkadianen Rhythmus vom Hypothalamus sezernierten Corticotropin Releasing Hormon (CRH). Über das hypophysäre adrenocorticotrophe Hormon (ACTH) kommt es an der Nebennierenrinde zur Freisetzung von antiinflammatorischen Corticosteroiden.

Neben dieser primären Kaskade ist eine Reihe anderer neuroimmunoendokriner Faktoren an der komplexen Antwort auf physischen und psychischen Stress beteiligt. Eine regulatorische Funktion an der HPA–Achse ist für eine Reihe von Zytokinen beschrieben, so sind insbesondere die stimulierende Wirkung von Interleukin 11 (IL-11) an der Hypophyse, sowie von Interleukin 6 (IL-6) an der adrenocorticalen Zelle bekannt (5;12;29;30). Einer überschießenden Stimulation der HPA-Achse wird durch negatives Feedback von Steroiden auf die CRH- und ACTH-Freisetzung entgegen gesteuert. Gleichzeitig wird durch die antiinflammatorische Wirkung der Glukokortikoide die Zytokinsekretion limitiert (Abb.1).

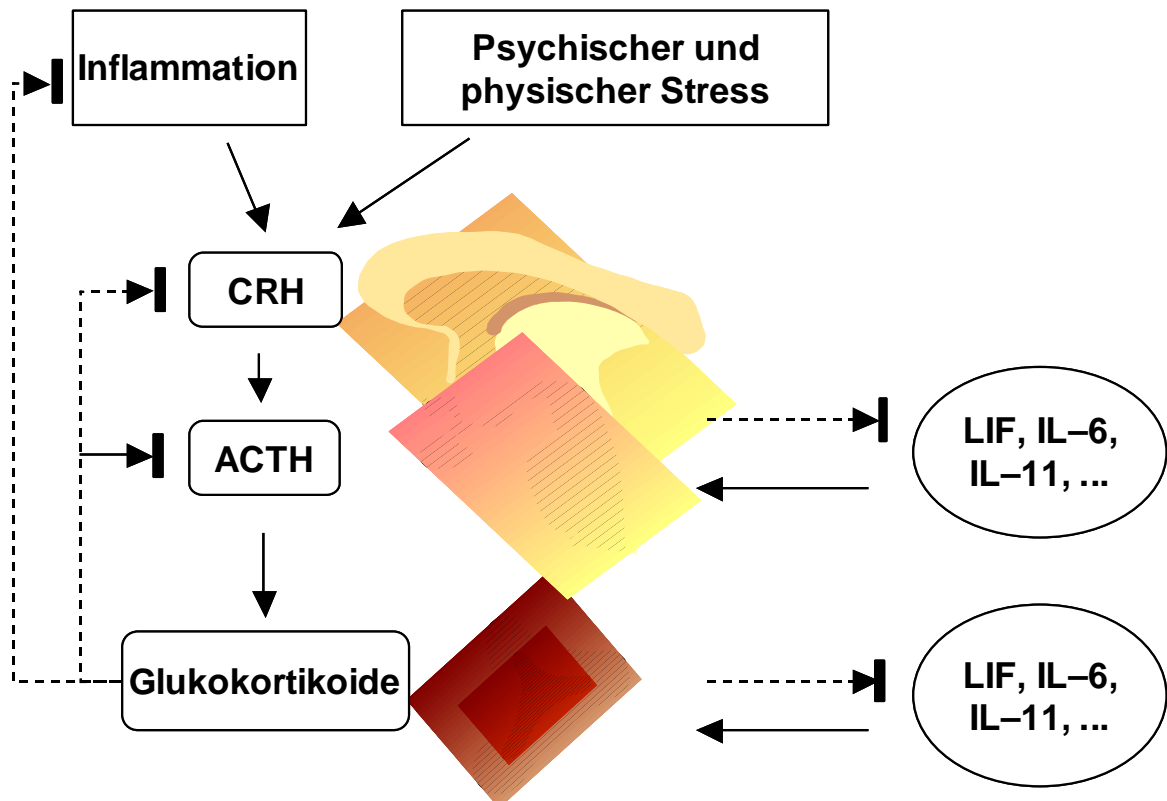


Abb. 1: Stressantwort durch die Hypothalamus–Hypophysen–Nebennierenrinden–Achse:

Vom Hypothalamus sezerniertes Corticotropin Releasing Hormon (CRH) stimuliert an der Hypophyse die Ausschüttung von adrenocorticotrophen Hormon (ACTH), welches zur Freisetzung von Glukokortikoiden durch adrenocorticale Zellen führt. Daneben wirken gp130-Zytokine als neuroimmunoendokrine Stimuli der HPA-Achse.

1.2. gp130-Zytokine

Zytokine werden als multifunktionelle Proteine von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen sezerniert. Sie übernehmen eine Reihe wichtiger biologischer Funktionen in unterschiedlichen Geweben und Organen, darunter in der Hämatopoese, im Immun- und im Nervensystem. Das Wirkungsprofil von Zytokinen ist charakterisiert durch Pleiotropie und Redundanz. So kann jedes einzelne Zytokin verschiedene biologische Aufgaben an unterschiedlichen Zelltypen ausführen (Pleiotropie). Andererseits können gleiche oder ähnliche Effekte an einem Zelltyp von verschiedenen Zytokinen, die über gemeinsame Rezeptoren und Signalwege agieren, hervorgerufen werden (Redundanz). Anhand struktureller Merkmale, gemeinsam genutzter Rezeptoruntereinheiten und Signalwegen und nach ihren funktionellen Aufgaben werden sie in verschiedene Zytokingruppen eingeteilt.

Die Mitglieder der gp130-Zytokinfamilie, auch IL-6 Zytokine genannt, zeichnen sich durch die gemeinsame transmembranäre Rezeptoruntereinheit Glykoprotein130 (gp130) aus (52). Die Gruppe der gp130-Zytokine umfasst Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-11 (IL-11), Leukemia Inhibiting Factor (LIF), Oncostatin M (OSM), Cardiotrophin-1 (CT-1), Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), Novel Neurotrophin-1/B-cell Stimulating Factor-3 (NNT-1/BSF-3) und Neuropoetin (NP) (34;53;83;98;99). Sie stellt eine Untergruppe der Klasse-I-Zytokin-Rezeptor-Familie dar. Die darunter zusammengefassten Zytokine kennzeichnet eine sequentielle und strukturelle Ähnlichkeit ihrer extrazellulären Rezeptordomänen aus, welche die Bindungsstelle der Zytokine beinhalten. Weitere Bestandteile von Klasse-I-Zytokin-Rezeptoren sind eine einzelne transmembranäre Region, sowie eine intrazelluläre Domäne ohne intrinsische Kinaseaktivität (18;53;98).

Bindung von IL-6 und IL-11 an die extrazelluläre Rezeptordomäne führt zur Homodimerisation von gp130 in hexameren Rezeptorkomplexen (gp130:IL-6R-IL-6 2:2:2, bzw. gp130:IL11R-IL-11 2:2:2). LIF bindet an einen heterodimeren Rezeptorkomplex

bestehend aus gp130 und LIFR. CT-1 bindet ebenfalls an den heterodimeren gp130/LIFR-Komplex, durch Assoziation mit einer noch nicht näher charakterisierten Rezeptoruntereinheit kommt es zur Ausbildung eines trimeren Rezeptorkomplexes. Auch humanes und murines OSM binden an einen heterodimeren Rezeptorkomplex, bestehend aus gp130 und der spezifischen OSMR-Untereinheit (OSMR Typ2), die Bindung von hOSM kann alternativ auch an den gp130/LIFR-Komplex (OSMR Typ1) erfolgen. Die Signalvermittlung von CNTF, NNT-1/BSF-3 und NP erfolgt jeweils über einen heterotrimeren Rezeptorkomplex bestehend aus gp130, CNTFR- α und LIFR (CNTFR- α :LIFR:gp130) (Abb.2 (7;12;22;34;48;49)).

Die Tatsache, dass die Mitglieder der IL-6 Familie über die gemeinsame Rezeptoruntereinheit gp130 agieren, erklärt zum Teil ihr partiell überlappendes und redundantes biologisches Wirkungsspektrum (10). Die zelltypspezifischen Effekte einzelner Zytokine lassen sich durch das Expressionsmuster der jeweils benötigten Rezeptoruntereinheiten im entsprechenden Erfolgsorgan erklären. Auch wenn eine benötigte transmembranäre Rezeptoruntereinheit in einem Gewebe fehlt, kann eine zytokinvermittelte Wirkung durch lösliche Rezeptoruntereinheiten in Kombination mit dem beinahe ubiquitär vorkommenden gp130 erklärt werden. Lösliche Rezeptoruntereinheiten (soluble receptors) entsprechen der extrazellulären Rezeptordomäne und sind für IL-6 (sIL-6R) (61;74), LIF (sLIFR), CNTF (sCNTFR) (67), und gp130 (sgp130) (101) beschrieben. Andererseits stellt die Signaltransduktion der gp130-Zytokine über gemeinsame Rezeptoreinheiten einen limitierenden Schritt für die Wirkung der einzelnen Zytokine dar, um synergistischen und additiven Effekten entgegen zu wirken.

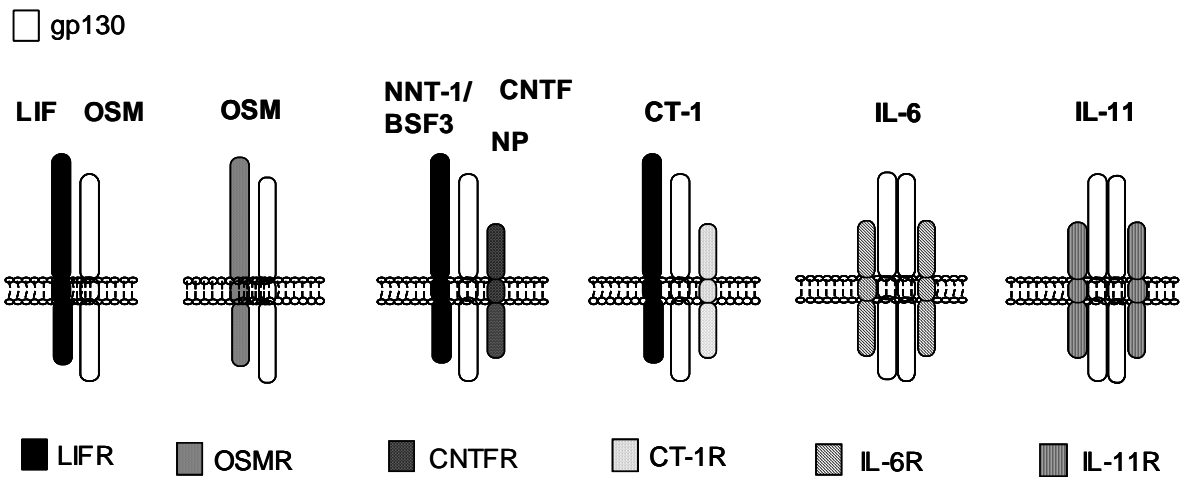


Abb. 2: Die Rezeptoren der gp130-Zytokine

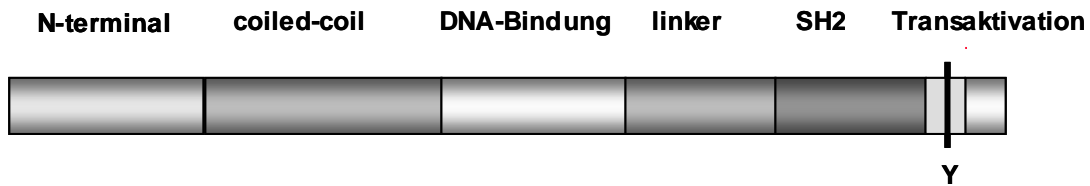
gp130-Zytokine binden an Rezeptorkomplexe, die aus gp130 und spezifischen Rezeptoruntereinheiten bestehen

1.3. Signaltransduktion der gp130-Zytokine

1.3.1. Jak–STAT–Signalkaskade

Die Jak–STAT–Kaskade wird als intrazellulärer Signalweg von einer Vielzahl von Zytokinen und Hormonen, bzw. Wachstumsfaktoren genutzt, so z.B. von gp130–Zytokinen (4;30;85;107;112), von Leptin, Wachstumshormon (4;8;47), Interferonen (73) und Prolaktin (108). Bindung der gp130-Zytokine an den extrazellulären Rezeptorkomplex führt zur Aktivierung der Janus Kinasen (Jak) und der Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT). Jak-1, Jak-2 und TYK-2 binden an die signaltransduzierenden Ketten von gp130, OSMR und LIFR. In der durch Autophosphorylierung aktivierten Form sind Januskinasen im Stande, bestimmte Tyrosinreste der intrazellulären Rezeptorkomponenten, sowie der STAT-Proteine zu phosphorylieren (Abb.4) (7;12;48-50).

Bislang sind sieben STAT-Proteine beschrieben: STAT-1, -2, -3, -4, -5a, 5b und -6 (32;48;117;118). Strukturanalysen von STAT-1, -3 und -4 konnten den Aufbau der STAT-Proteine aus fünf Domänen aufzeigen (Abb.3): eine aminoternale „coiled coil“ Region, die die Bildung von oligomeren STAT-Komplexen ermöglicht, eine DNA–bindende Region, eine linker-Region, eine SH2-Region, an die die Bindung von Phosphotyrosinresten erfolgt und eine Transaktivations–Region, die mit transkriptionellen Kofaktoren, wie z.B. CBP/p300 interagiert (19;28;48).



(nach Heinrich P.C. (48))

Abb. 3: Struktureller Aufbau der STAT-Proteine

Allen STAT-Proteinen gemeinsam ist ihre strukturelle Zusammensetzung aus einer aminoterminalen Dimerisations-Region („coiled coil Region“), der DNA-bindenden Region, der linker-Region, der SH2-Region und der Transaktivations-Region.

Alle IL6-Zytokine aktivieren durch ihre gemeinsame Rezeptoruntereinheit gp130 STAT-3 und in geringerem Ausmaß auch STAT-1 (49). Darüber hinaus wird STAT-5 über den gp130/LIFR-Komplex und gp130/OSMR-Komplex aktiviert, wobei die deutlichste Aktivierung von STAT-5 über den gp130/OSMR-Komplex beschrieben wurde (62). Voraussetzung für die Aktivierung von STAT-1 und STAT-3 ist eine transiente Assoziation mit spezifischen Tyrosinresten des Zytokinrezeptors über ihre SH2-Domäne (46). Hingegen ist die Rezeptorbindung keine Bedingung für die Aktivierung von STAT-5, sie erfolgt durch direkte Interaktion von STAT-5 mit den Januskinasen (40). Durch Phosphorylierung des C-terminalen Tyrosinrests von STAT-1 (Y701) und STAT-3 (Y705) kommt es zur Bindung zwischen der SH2-Domänen eines STAT-Proteins an den C-terminalen Phosphotyrosinrest eines anderen STAT-Proteins und somit zur Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren (STAT-3:STAT-3, STAT-3:STAT-1 oder STAT-1:STAT-1) (19;28;38;78;81;85;99).

In der dimerisierten Form gelangen die STAT-Proteine über einen aktiven Prozess in den Zellkern, wo sie mit ihrer DNA-bindenden Domäne an spezifische STAT-bindende Elemente in der Promotorregion verschiedener Gene binden und als Transkriptionsfaktoren wirken (12;57;109).

1.3.2. MAPK Signalweg

Neben dem Jak-STAT-Signalweg wird auch die Kaskade der Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) von IL-6 Zytokinen aktiviert (Abb.4). Über diese Proteinkinasen werden eine Vielzahl zellulärer Vorgänge wie etwa Zelldifferenzierung und -wachstum, metabolische Funktionen und Apoptose vermittelt.

Die Familie der gp130-Zytokine aktiviert neben den MAPKinasen ERK1/2 auch die MAPKinasen p38 und JNK. Für ERK1/2 ist die Aktivierungskaskade bereits beschrieben. Nach Tyrosinphosphorylierung der Rezeptoruntereinheiten bindet die Protein-Tyrosin Phosphatase SHP2 an gp130 (Y759) (96) und LIFR (Y974) (92), wird JAK-1 abhängig phosphoryliert (91) und interagiert mit dem Grb2/SOS-Komplex (41). Es folgt die Aktivierung der Ras/Raf/MAPK-Kaskade. Hingegen erfolgt die Aktivierung des Ras/Raf/MAPK-Signalwegs durch den gp130/OSMR-Komplex nicht über die Bindung von SHP2, sondern über das Adapterprotein Shc, das an den Tyrosinrest Y861 in der zytoplasmatischen Region des OSMR bindet (51). Auch an diesem alternativen Weg ist Gbr2 durch seine Bindung an phosphoryliertes Shc beteiligt (51).

Über welchen Mechanismus die Aktivierung von p38 und JNK erfolgt, ist noch nicht vollständig geklärt. p38 und JNK sollen an der zellulären Antwort auf Stress, Entzündung und apoptotischem Zelltod beteiligt sein und werden von Lipopolysacchariden, IL-1, Tumor Necrosis Factor (TNF) oder durch externe Faktoren wie z.B. UV-Bestrahlung aktiviert (48).

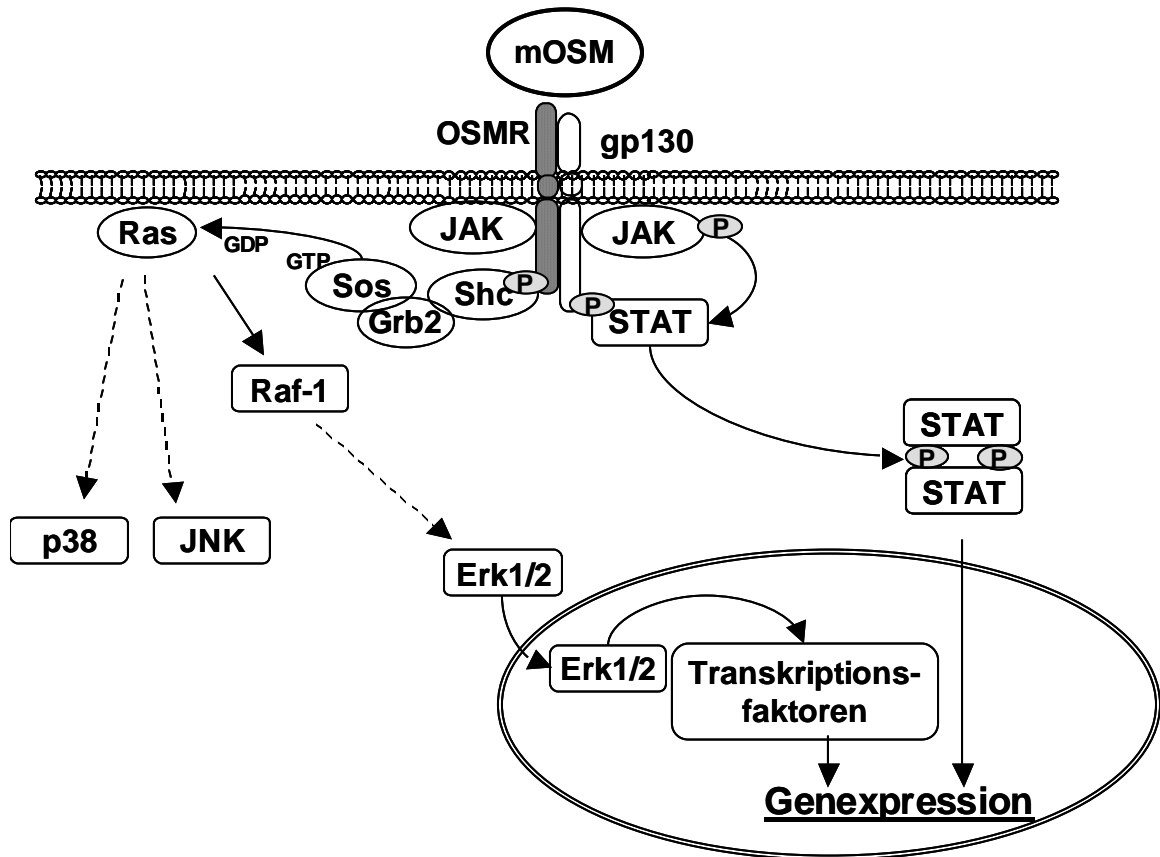


Abb. 4: Signaltransduktion über den gp130/OSMR-Komplex

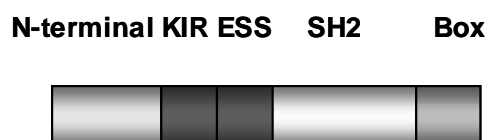
Januskinasen phosphorylieren spezifische Tyrosinreste an intrazellulären Rezeptordomänen. STAT-Proteine binden an diese und werden durch Phosphorylierung aktiviert. Als homo- und heterodimere Komplexe gelangen STAT-Proteine in den Nucleus, wo sie an spezifische STAT-Bindungs-elemente in der 5'-Region verschiedener Gene binden und dadurch deren Transkription initiieren. Eine alternative Signalkaskade stellt der MAPK-Signalweg dar.

1.4. Limitierung der Zytokinwirkung

Verschiedene Mechanismen zur Limitierung der Zytokinwirkung sollen einer Überstimulation entgegenwirken (Abb. 6). Die Rolle der SOCS-Proteine, PIAS und Protein Tyrosin Phosphatasen wird im folgenden vorgestellt.

1.4.1. SOCS-Proteine

1997 wurde die Gruppe der Surpressor of Cytokine Signaling (SOCS) (97) erstmals beschrieben und synonym Jak-binding Protein (JAB) (36), STAT-inducible STAT Inhibitors (SSI) (77) und cytokine inducible SH2 protein (CIS) benannt. Die SOCS-Familie umfasst acht Proteine, die als CIS sowie SOCS-1 bis SOCS-7 klassifiziert werden (97). Gemeinsam ist allen SOCS-Proteinen der strukturelle Aufbau aus einer variablen aminoterminalen Region, einer zentralen SH2-Domäne und aus einer circa 30 Aminosäuren umfassenden carboxyterminalen homologen Sequenz, die als „SOCS-box Motiv“ bezeichnet wird (Abb.5) (48;97).



(nach Heinrich P.C.(48))

Abb. 5: Struktureller Aufbau der SOCS-Proteine

An eine variable aminoterminalen Region schließen sich die „Kinase Inhibitory Region“ (KIR), die „Extended SH2 Subdomain“ (ESS) und die SH2-Domäne an. Am carboxyterminalen Ende befindet sich ein „SOCS box“ genanntes Motiv.

Die verschiedenen SOCS-Proteine hemmen die Jak-STAT-Kaskade auf unterschiedliche Weise. SOCS-3 und SOCS-1 inhibieren die Kinaseaktivität von Jak2, indem sie mit ihrer zentralen SH2-Domäne und ihrer Kinase Inhibitory Region (KIR) an die katalytische Region von Jak2 binden (79). SOCS-1 bindet mit seiner SH2-Domäne an den phosphorylierten Tyrosinrest Tyr1007 der JH1-Kinaseregion von Jak2. Darüber hinaus ist eine Bindung von SOCS-1 an Jak1, JAK3 und Tyk2 bekannt.

Das carboxyterminale „SOCS box“ Motiv ist an der Bindung der SOCS-Proteine an Jak nicht beteiligt. Durch Assoziation des „SOCS box“ Motiv mit Elongin C und B wird ein E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex gebildet, welcher zur Ubiquitierung sowohl von SOCS-Proteinen selbst als auch von spezifischen SOCS-gebundenen Substraten führt und so letztlich die proteolytische Spaltung von SOCS-gebundenen Proteinen durch das 26S Proteasom auslöst (115;116). Die proteolytische Spaltung der SOCS-gebundenen Zielsubstrate kann durch Proteasom-Inhibitoren gehemmt werden. SOCS-3 assoziiert zudem mit spezifischen Phosphotyrosinresten aktivierter intrazellulärer Zytokinrezeptordomänen, z.B. von gp130, EpoR und LeptinR (21;39;55;56;80;89;93). Es wird diskutiert, dass SOCS-3 so die Bindung anderer Proteine, wie STAT oder SHP2 an die Rezeptoruntereinheiten beeinflusst und letztlich deren Aktivierung verhindert. Quantitative Studien, welche die Bindungskapazitäten von SOCS-3 für Januskinasen, STAT-Proteine und gp130 untersuchten, zeigten die weitaus größte Affinität von SOCS-3 zum Phosphotyrosinrest Tyr757 der intrazellulären gp130-Rezeptoruntereinheit, die der Bindungsstelle für die Phosphatase SHP2 entspricht (80;93).

In den Promotorregionen der für CIS (105;106) und für SOCS-1 und SOCS-3 (35) kodierenden Gene konnten funktionell essentielle STAT-bindende Sequenzen identifiziert werden. Die Genregulation von SOCS-Proteinen ist somit STAT-abhängig. SOCS-1 und SOCS-3 üben über die Inhibition der STAT-3 Phosphorylierung einen negativen Effekt auf ihre eigene STAT-abhängige Expression aus, wodurch einer intrazellulären Akkumulation von SOCS-Proteinen entgegengesteuert wird.

1.4.2. PIAS

Zur Gruppe der Protein Inhibitors of Activated STATs (PIAS) zählen die fünf Mitglieder PIAS1, PIAS3, PIAS α , PIAS β und PIAS γ . Sie hemmen als zytoplasmatische Faktoren die Translokation von aktivierten STAT-Komplexen in den Zellkern (31;68;69).

1.4.3. Protein Tyrosin Phosphatasen

Eine wesentliche Rolle in der Regulation von gp-130 Zytokin vermittelter Signale kommt den Phosphatasen als Gegenspieler der phosphorylierenden Kinasen zu.

Die Protein-Tyrosin Phosphatase SHP2 übt neben der positiven Wirkung auf die Aktivierung der MAPKinasen eine inhibierende Funktion auf die Jak-STAT-Kaskade aus (64). SHP2 bindet an den zytoplasmatischen Tyrosinrest Y759 der aktivierten gp130-Rezeptoruntereinheit (23) und entfaltet dadurch seine enzymatische Aktivität (63).

TYK-2, JAK-1 und JAK-2 konnten als Substrate von SHP2 identifiziert werden. Mit welchen Proteinen SHP2 darüber hinaus interagiert, bleibt zu klären. Eine Reihe weiterer Phosphatasen, wie PTP ϵ , PTP1B, CD45 und SHP1 sind an der Regulierung der Jak-STAT-Kaskade beteiligt (24;59;76;103).

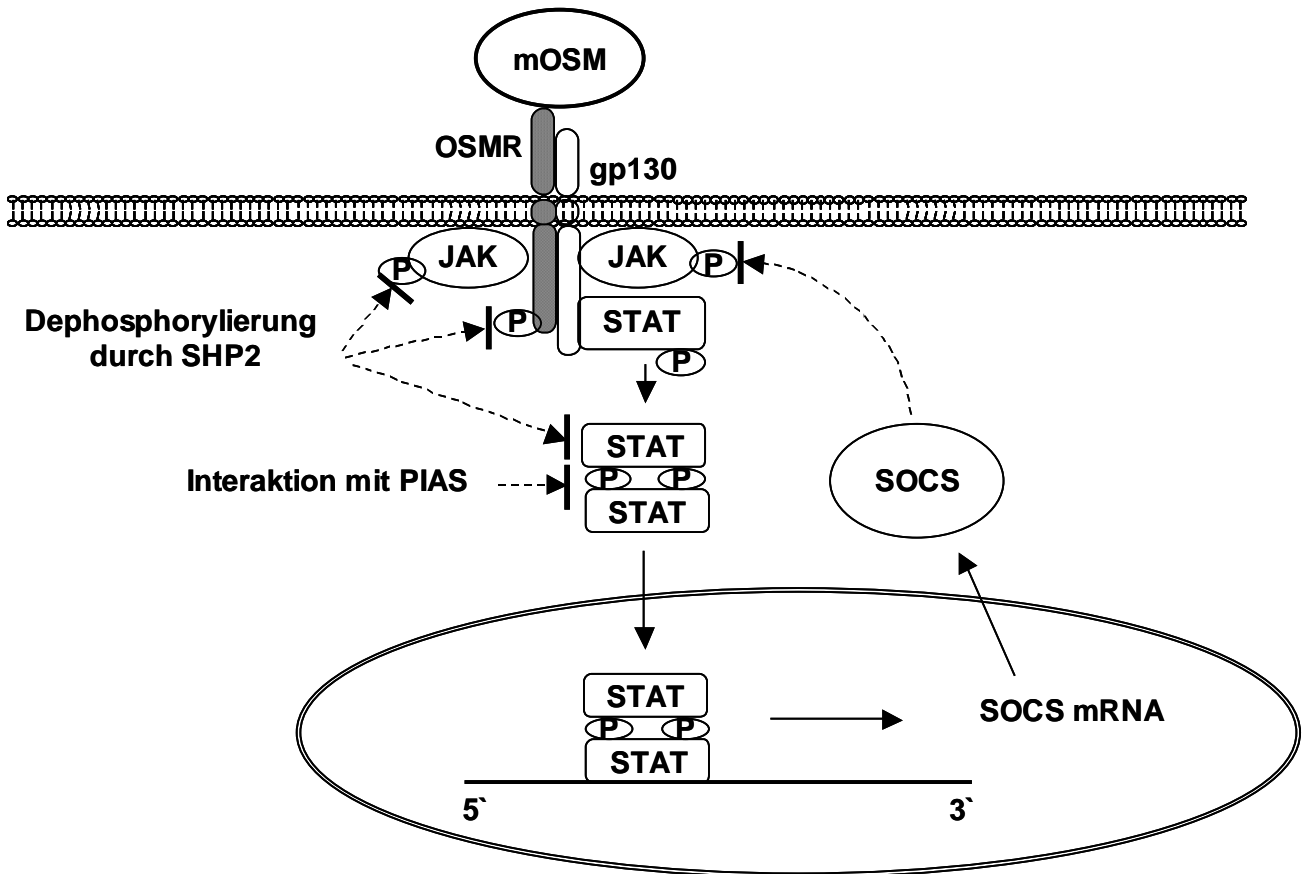


Abb. 6: Limitierung der gp130/OSMR-rezeptor-vermittelten Signaltransduktion.

Die durch den gp130/OSMR-Komplex induzierte Signalwirkung wird durch PIAS, SHP2 und die Gruppe der STAT-abhängigen SOCS-Proteine reguliert.

1.5. Oncostatin M

Zarling et al. gelang 1986 die Isolation eines Polypeptids aus dem Überstand der PMA-stimulierten histiozytären Lymphom-Zelllinie U-937, das aufgrund seiner Eigenschaft, das Wachstum von Tumorzellen zu blockieren Oncostatin M genannt wurde (113).

Die Sekundärstruktur des 28kD Glykoproteins besteht aus vier alpha-Helix-Ketten mit drei nach innen gerichteten Helix-Regionen. Damit zeigt OSM neben funktionellen Gemeinsamkeiten auch signifikante strukturelle Übereinstimmungen mit den anderen gp130 Zytokinen. Insbesondere mit LIF teilt OSM eine 27%-ige strukturelle Homologie (45;54;113). Das für OSM kodierende Gen liegt auf Chromosom 22q12 (44) und somit auf dem selben Chromosom wie das LIF-Gen, lediglich 20kb von diesem entfernt. Diese Tatsache lässt die Entstehung der beiden Gene aus ursprünglich einem Gen durch Duplikation vermuten (43;87).

Die Signaltransduktion von humanem OSM (hOSM) erfolgt in menschlichen Zellen über zwei verschiedene Rezeptorkomplexe, indem es sowohl an den gp130/OSMR (OSMR Typ2) als auch an den gp130/LIFR-Komplex (OSMR Typ1) binden kann (67;101;107). In murinen Zellen erfolgt die Signaltransduktion von hOSM ausschließlich über den gp130/LIFR-Komplex, nicht jedoch über den gp130/OSMR-Komplex (67;101;107). Anders als das humane Oncostatin M bindet das 1996 klonierte murine Oncostatin M (mOSM) im murinen Zellmodell ausschließlich an den gp130/OSMR-Komplex, nicht jedoch an den gp130/LIFR-Komplex (Abb.7) (67;101;107;112).

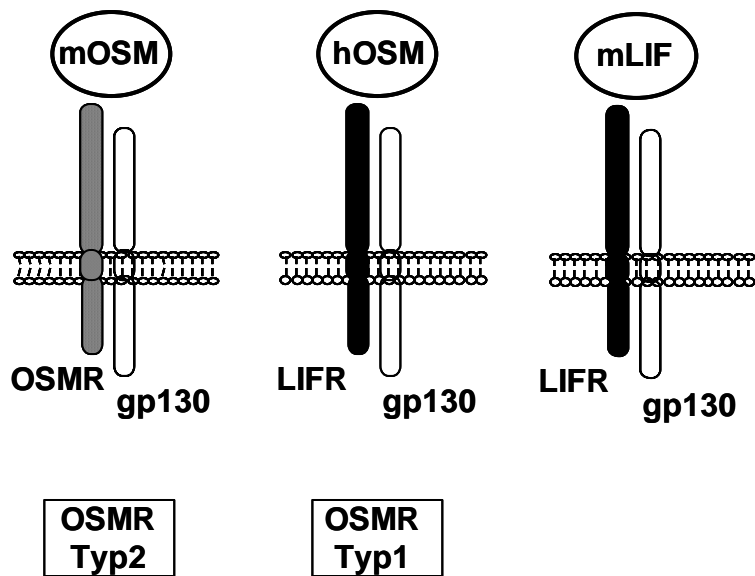


Abb. 7: Rezeptorbindung von OSM im murinen Zellmodell

Murines Oncostatin M bindet ausschließlich an den spezifischen gp130/OSMR-Komplex. In murinen Zellen bindet hOSM aufgrund strikter Spezifität des OSM/gp130-Komplexes ausschließlich an den auch von LIF genutzten gp130/LIFR-Komplex

1.6. Apoptose: programmierter Zelltod

1972 wurde der Begriff Apoptose als Bezeichnung für eine genetisch determinierte Form des Zelltodes in die biomedizinische Literatur eingeführt. Dieser „programmierte Zelltod“ stellt einen aktiven Prozess dar und kann Folge von Schäden auf mitochondrialer Ebene oder DNA-Ebene, Aktivierung zytotoxischer T-Zellen oder viraler Angriffe sein, tritt aber genauso unter physiologischen Bedingungen auf, um eine regelrechte Entwicklung und Homeostase des Organismus zu gewährleisten. Apoptose ist deutlich von Nekrose als Folge toxischer Einflüsse und damit eines massiv gestörten Umgebungsmilieus abzugrenzen. Fehlende apoptotische Aktivität wird als essentieller Faktor bei pathologischen Prozessen, wie der Entstehung von Karzinomen (100) und neurodegenerativen Erkrankungen (6) diskutiert.

Der Prozess der Apoptose führt in seiner Komplexität zu charakteristischen morphologischen Veränderungen, wie Schrumpfen des Zellkerns und des Zytoplasmas, Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung. Einen zentralen Schritt stellt dabei die irreversible proteolytische Spaltung zellulärer Bausteine durch die Enzymgruppe der Caspasen dar. Caspasen zeichnen Gemeinsamkeiten in ihrer Aminosäuresequenz, Proteinstruktur und Substratspezifität aus. Ihre inaktiven Vorstufen sind aus drei Domänen aufgebaut: eine aminoterminalen Domäne variabler Länge und Struktur und zwei weiterer, ca. 10 und 20 kD großen Untereinheiten. Während der aminoterminalen Domäne vor allem regulierende Funktionen im Aktivierungsprozess zukommen, heterodimerisieren die beiden anderen Untereinheiten nach der Aktivierung und bilden dadurch die Voraussetzung für die folgende Substratbindung und proteolytische Aktivität der Caspasen (104).

Eines der am besten untersuchten Zielproteine der Caspasen (vor allem der Caspase-3 und Caspase-7) ist die nukleäre Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP). PARP ist ein multifunktionelles Protein, das Brüche im DNA-Strang erkennt und Reparaturmechanismen initiiert (95;100;104;110;111).

1.7. Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Effekte von OSM an der Hypophysen–Nebennierenrinden-Achse näher zu beleuchten. Dabei sollen Aussagen über die Wirkung von OSM an der corticotrophen Zelle gemacht, sowie Effekte auf adrenocorticaler Ebene, insbesondere die Stimulation der Steroidsekretion und Induktion von Apoptose diskutiert werden.

Durch Vergleich der Wirkungsweise der gp130/LIFR Liganden (hOSM und mLIF) und des gp130/OSMR Liganden (mOSM) sollen spezifische Aussagen über die entscheidenden Signalwege an der zytokinvermittelten HPA-Achsen-Antwort gemacht werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Zellkultur

Brutschrank Typ CO₂-AutoZero®, Heraeus instruments (Osterode, BRD)

Sicherheitswerkbank LaminAir®, Heraeus instruments (Osterode, BRD)

Microzentrifuge MC13, Millipore (Billerica, MA, USA)

Mikroskop, Carl Zeiss (Oberkochen, BRD)

Vortex, Leuko Instrumenten (Harb am Neckar, BRD)

Neubauer-Zählkammer

Pipettboy, Falcon Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)

Präzisionspipetten (Eppendorf, Hamburg, BRD)

Multipipetten (Eppendorf, Hamburg, BRD)

Glas-Pipetten (Eppendorf, Hamburg, BRD)

Pasteurpipetten (Eppendorf, Hamburg, BRD)

Gewebekulturflaschen, 75cm² und 175cm², Falcon Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)

Gewebekulturplatten Ø100 mm und Ø60 mm, Falcon Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)

Multiloch-Gewebekulturplatten, 6-Loch, Falcon Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)

Multiloch-Gewebekulturplatten, 96-Loch, Falcon Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)

Zellschaber, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Millipore-Filter 0,22µm, Millipore (Billerica, MA, USA)

Zentrifugenröhrchen 50 ml und 15 ml, Falkon Becton Dickinson(Heidelberg, BRD)

Y1-Zellen, American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)

AtT-20 Zellen, American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)

Dulbecco`s modification of Eagle`s Medium (DMEM), Gibco BRL Life Technologies (Grand Island, NY, USA)

Hams F10 Medium, Gibco BRL Life Technologies (Grand Island, NY, USA)

Fetales Kälber Serum, Biochrom (Berlin, BRD)

Pferdeserum, Biochrom (Berlin, BRD)

L-Glutamin, Biochrom (Berlin, BRD)

Bovines Serum Albumin (BSA) low endotoxin, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Phosphate Buffer Saline (PBS; 270 mM NaCl, 13mM Na₂HPO₄-2H₂O, 5mM KCl, 2mM K₂HPO₄), Apotheke Klinikum Großhadern (München, BRD)

PBS gereinigt, Biochrom (Berlin, BRD)

ACTH-Synacthen (0,25mg/ml), Novartis Pharma GmbH (Nürnberg, BRD)

Trypsin, Biochrom (Berlin, BRD)

DMSO, Sigma (St. Louis, MO, USA)

2.1.2. Stimulationsversuche

Rekombinantes mLIF, R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)

Rekombinantes hOSM, R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)

Rekombinantes mOSM, R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)

2.1.3. RT-PCR

Thermocycler GeneAmp® PCR System 2400, Perkin–Elmer (Foster City, CA, USA)

UV-Tisch (312nm), Intas (Göttingen, BRD)

Video Graphic Printer UP890CE, Intas (Göttingen, BRD)

Elektrophoresekammer Biometra Agargel Mini, Biometra (Göttingen, BRD)

Microzentrifuge MC13, Millipore (Billerica, MA, USA)

Vortex, Leuco instrumenten (Harb am Nekar, BRD)

Photometer Ultrospec Plus, Pharmacia Biosystems (Milwaukee, WI, USA)

100µl Gefäße, DNase-frei (Eppendorf, Hamburg, BRD)

Qiaex II Gel Extraction Kit, Quiagen (Hilden, BRD)

Trizol-Reagenz, Gibco BRL Life Technologies (Grand Island, NY, USA)

Isopropanol, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Chloroform zur Analyse, Merck (Darmstadt, BRD)

Ethanol 75% zur Analyse, Merck (Darmstadt, BRD)

0,1% DEPC-H₂O, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Agarose, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Strand-Puffer, Gibco BRL Life Technologies (Grand Island, NY, USA)

0,1M DTT, Gibco BRL Life Technologies (Grand Island, NY, USA)

dNTPs, Gibco BRL Life Technologies (Grand Island, NY, USA)

Random-Primer, Gibco BRL Life Technologies (Grand Island, NY, USA)

RNAasin, Promega (Madison, WI, USA)

M-MLV Reverse Transkriptase, Gibco BRL Life Technologies (Grand Island, NY, USA)

DMSO, Sigma (St. Louis, MO, USA)

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

Primer (Sense, Antisense), Carl Roth (Karlsruhe, BRD)

DNA-Marker, Amersham (Braunschweig, BRD)

Agarose, Gibco BRL Life Technologies (Grand Island, NY, USA)

Tris, Carl Roth (Karlsruhe, BRD)

Bohrsäure, ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA, USA)

EDTA, Merck (Darmstadt, BRD)

MiniPrep®, Qiagen (Hilden, BRD)

T4 DNA Ligase, Gibco BRL Life Technologies (Grand Island, NY, USA)

2.1.4. Westernblot

Immobilon–PVDF-Folie, Millipore (Billerica, MA, USA)

Filterpapier (Whatman 3CHR und 1CHR), Biometra (Göttingen, BRD)

Autoradiographiefilm XOMAT–AR®, Eastman Kodak (Rochester, NY, USA)

Elektrophorese-Kammer MiniProtean, Biorad (Hercules, CA, USA)

Semidry-Graphit–Elektroden (Laborwerkstätten Klinikum Großhadern, München, BRD)

Schüttler Rocker Platform, Bellco Glass, Inc. (Vineland, NJ, USA)

Hepes, Boehringer Mannheim Biochemicals (Mannheim, BRD)

Natriumchlorid, Merck (Darmstadt, BRD)

EDTA [Tripex III], Merck (Darmstadt, BRD)

Natriumpyrophosphat [$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$], Sigma (St. Louis, MO, USA)

Natriumfluorid [NaF], Sigma (St. Louis, MO, USA)

Sodium Orthovanadate, Sigma (St. Louis, MO, USA)

DDT, Sigma (St. Louis, MO, USA)

SDS, Merck (Darmstadt, BRD)

Tween20, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Tris, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Methanol, Sigma (St. Louis, MO, USA)

6-Aminohexansäure, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Anti-pSTAT3–Antikörper, Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA)

Anti-pSTAT1–Antikörper, Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA)

Anti-pSTAT5–Antikörper, Cell Signaling, Cummings Center (Beverly, MA, USA)

Anti-Stat-3-Antikörper, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)

Anti-Stat-1-Antikörper, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)

Anti-cPARP–Antikörper, Cell Signaling, Cummings Center (Beverly, MA, USA)

Anti-cCaspase-3, Cell Signaling, Cummings Center (Beverly, MA, USA)

Anti-STAT-5–Antikörper, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)

Anti-PARP–Antikörper, Cell Signaling, Cummings Center (Beverly, MA, USA)

Anti-Caspase-3, Cell Signaling, Cummings Center (Beverly, MA, USA)

Goat-Anti-Mouse-POD-Antikörper, Pierce (Rockford, IL, USA)

Donkey-Anti-Rabbit–POD-Antikörper, Pierce (Rockford, IL, USA)

SuperSignalWest Dura Extended Duration Chemolumineszenz–Substrat, Pierce (Rockford, IL, USA)

Essigsäure, Apotheke Klinikum Großhadern (München, BRD)

Urea, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Triton X100, Serva (Heidelberg, BRD)

PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), Sigma (St. Louis, MO, USA)

Aprotinin, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Leupeptin, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Lysispuffer: 50mM Hepes, 150mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM Na₄P₂O₇, 100mM NaF,
2 mM Sodium Othovanadat, pH 7,4), 1% Triton X100, 1mM PMSF, 20µM
Leupeptin, 2µg/ml Aprotinin (2‰)

Probenpuffer: 0,1% DDT, 1% Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS) in 0,1M Tris-Hcl, pH 8,3

Anode-I-Puffer: 0,3M Tris, 20% Methanol

Anode-II-Puffer: 0,025M Tris, 20% Methanol

Kathodenpuffer: 0,04M Aminohexansäure, 20% Methanol, 0,01% SDS

1,5% Tween20–PBS - Puffer: 0,1M Phosphat, 0,15M NaCl (pH 7,5), 1,5% Tween 20

Waschlösung I: 2% SDS, 7M Urea, destilliertes Wasser

Waschlösung II: 10% Essigsäure, destilliertes Wasser

2.1.5. Luciferase-Assay

Luminometer Lumat LB 9507, Berthold (Bad Wildbach, BRD)

Messröhrchen, Falcon Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)

Superfect® Transfection Reagent, Qiagen (Hilden, BRD)

BSA low-endotoxin, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Tris [C₄H₁₁NO₃] , Carl Roth (Karlsruhe, BRD)

Glycerol, Merck (Darmstadt, BRD)

Magnesiumchlorid, Merck (Darmstadt, BRD)

Triton X100, Serva (Heidelberg, BRD)

EDTA [Triplex III], Merck (Darmstadt, BRD)

ATP, Amersham (Cleveland, OH, USA)

Luciferin, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Lysispuffer: 1,25ml 1M Tris (pH 7,8), 7,5ml 87% Glycerol, 500µl 1M MgCl, 500µl TritonX 100, 100µl 0,5M EDTA (pH 8), mit aqua dest. auf 50ml aufgefüllt

Messpuffer: 66% Lysispuffer, 0,8mM ATP, 0,3mM D-Luciferin, Aqua dest.

2.1.6. Radioimmunassay

Gammacounter Multigamma 1261, LKB Wallac (Turku, Finnland)

Zentrifuge Hettich, Roto Silenta K, Hettich AG (Bäch, Schweiz)

Polystyrolröhrchen 3,5 ml, Sarstedt (Nürnbrecht, BRD)

Software Ria–Calc, Pharmacia (Milwaukee, WI, USA)

Corticosteron, Merck (Darmstadt, BRD)

BSA, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Corticosteron-Tracer, ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA, USA)

ACTH–RIA, Diagnostic System Laboratories (Webster, TX)

Kaninchen–Anti–Corticosteron-Antikörper, ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA, USA)

Kaninchen-Gammaglobulin, Serva (Heidelberg, BRD)

Schaf-Anti-Kaninchen-Gammaglobulin, Paesel (Frankfurt / Main, BRD)

Phenolrot, Merck (Darmstadt, BRD)

Polyethylenglycol 6000, Serva (Heidelberg, BRD)

Puffer: 0,1% Teen20, PBS

Inkubationspuffer: (1000ml PBS + 1g BSA + 0,1g NaN₃, pH 7,0),

Polyethylenglycollösung (1000ml PBS, 60g Polyethylenglycol 6000,
pH 7,0)

1.Antikörperlösung: 20ml Inkubationspuffer, 100µl Kaninchen–Anti–Corticosteron-Antikörper (1.AK, 1:200), 20µl Kaninchen–Gammaglobulin-Ausgangslösung (7µg/ml), 200µl Phenolrot

Präzipitierungslösung: 80ml 6%ige Polyethylenglycollösung, 100µl Schaf–Anti-Kaninchen Gammaglobulin (2.AK, 1:800)

2.1.7. Proliferationsassay

ELISA Sunrise Remote Control, Tecan (Crailsheim, BRD)

96 Well Microplatten, Greiner bio-one (Frickenhausen, BRD)

CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega (Madison, WI, USA)

Allgemeiner Caspase-Inhibitor Z–VAD-FMK, Bachem Germany (Heidelberg, BRD)

Jak2 Inhibitor AG490, Calbiochem (La Jolla, CA, USA)

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Zelllinien Y-1 (murine adrenocorticale Tumorzelllinie) und AtT-20/D16v-F2 (murine corticotrophe Tumorzelllinie) wurden ursprünglich von ATCC (Manassas, VA, USA) bezogen. Y-1 Zellen wurden in komplettem Hams F10 Medium (Hams F10 unter Zusatz von 15% Pferdeserum, 2,5% fetalem Kälberserum und 2mM Glutamin), AtT-20 Zellen in komplettem Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum und 2mM Glutamin) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Belüftung gezüchtet. Zum Passagieren der Zellen wurde eine 1%ige Trypsin-Lösung in sterilem PBS verwendet. Nach Absaugen des Wachstumsmedium wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und eine ausreichende Menge Trypsinlösung in die Gewebekulturflaschen gegeben, um deren Boden gerade zu bedecken. Nach einer Einwirkzeit von wenigen Minuten im Brutschrank hatten sich die Zellen vom Boden der Kulturflaschen gelöst. Der Trypsinierungsprozess wurde durch Zugabe von Wachstumsmedium gestoppt. Dabei wurde eine zweifache Menge der Trypsinlösung an Wachstumsmedium verwendet. Die Zellsuspension wurde in Zentrifugenröhrchen (50 ml) pipettiert und zentrifugiert, um das zugegebene Trypsin von den Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in PBS gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren in komplettem Zellkulturmedium gelöst. Die weitere Kultivierung erfolgte in Gewebekulturflaschen. Ein Mediumwechsel wurde jeden zweiten Tag durchgeführt, wobei das zugegebene Volumen für die 175 cm²-Gewebekulturflaschen etwa 20 ml, für die 75 cm²-Gewebekulturflaschen etwa 10 ml betrug. Für die Versuche wurde die Zellkonzentration mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt und die Zellen in der jeweiligen Dichte in komplettem Medium ausgesät. Nach einer entsprechenden Wachstumsphase wurde das komplette Medium gegen serumfreies Medium

(Hams F10, bzw. DMEM unter Zusatz von 0,1% bovinen Serum Albumin (BSA) und 2mM L-Glutamin) ausgetauscht und über Nacht belassen.

Vor der Stimulation wurde das serumfreie Medium erneuert. Die Zytokine wurden in gleichen Konzentrationen und Volumenmengen zugegeben, den unstimulierten Kontrollgruppen wurde die entsprechende Menge serumfreies Medium zupipettiert. Nach der jeweiligen Inkubationsphase im Brutschrank wurden Proben zu den entsprechenden Zeitpunkten entnommen.

2.2.2. RT-PCR

RNA-Extraktion

Die Zellen wurden in einer Dichte von $1,8 \times 10^6$ Zellen pro Gewebekulturplatten (Durchmesser 10cm) in 6ml komplettem Wachstumsmedium ausgesät. Nach einer 48stündigen Wachstumsphase wurde das komplette Medium gegen serumfreies Medium (unter Zusatz von 0,1% endotoxinfreiem BSA und 2mM L-Glutamin) ausgetauscht und über Nacht belassen. Am nächsten Morgen wurde das serumfreie Medium erneuert.

Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und diese sofort in jeweils 500µl Trizol lysiert. Die Trizol-Zellsuspension wurde mit einem Zellschaber vollständig von der Gewebekulturplatte gelöst und in sterile Eppendorfgefäße überführt.

Für die RNA-Gewinnung aus primären murinen Nebennierenrinden- und Hypophysengewebe wurden nach der Organentnahme kleine Stücke in sterile Eppendorfgefäße gefüllt, auf Trockeneis schockgefroren und anschließend 500µl Trizol zugegeben. Die weitere RNA-Extraktion aus der Trizol-Suspension erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Pro Eppendorfcup wurden 200µl Chloroform zupipettiert, der Inhalt vorsichtig durch wiederholtes

Wenden vermischt und für 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Probengefäße mit 12000rpm (rounds per minute) in der Ultrazentrifuge für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Die in der oberen wässrigen Phase enthaltene RNA wurde nun vorsichtig in sterile Eppendorfgefäße überführt, ohne dabei die untere DNA- und Proteinschicht zu zerstören. Pro Eppendorfgefäß wurden 500µl Isopropanol zupipettiert, mit der RNA vermischt (Vortex) und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden erneut mit 12000rpm bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Dadurch setzte sich die RNA am Boden des Eppendorfcups ab. Der Überstand wurde durch Abpipettieren verworfen. Der RNA-Niederschlag wurde erneut mit 1ml 75%igem Ethanol gewaschen und bei 7000rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand mit einer Pipette verworfen und das geöffnete Eppendorfcup so lange in einen Heizblock bei 60°C gestellt, bis der Rest des Ethanols verdampft, das RNA-Pellet jedoch nicht ausgetrocknet war. Die nun gewonnene RNA wurde in 10-20µl 0,1% DEPC-H₂O aufgelöst und bei -80°C für mindestens 12 Stunden eingefroren.

Nach dem Auftauen wurde die RNA nochmals für wenige Minuten auf 68°C erhitzt, durch mehrmaliges Pipettieren gelöst und die Konzentration bei 260nm photometrisch bestimmt. Aus der gemessenen Extinktion wurde die Absolutmenge RNA durch folgende Formel errechnet:

$$\text{RNA-Konz.}[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = [\text{OD}_{260}] \times 0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times [\text{Verdünnungsfaktor}]$$

Reverse Transkriptase-Reaktion

1µg reine mRNA wurde in 11,3µl DEPC-H₂O gelöst und in einem DNA-freien 100µl-Probengefäß vorgelegt. 4µl 10fach-Puffer, 2µl 0,1M DTT, 0,4 µl dNTPs und 0,6µl Random-Primer wurden zupipettiert und durch vorsichtiges Schütteln vermischt. 0,5µl RNasin und 1,2µl Reverse Transkriptase wurden erst direkt vor Reaktionsbeginn zugegeben.

Die reverse Transkription von mRNA in cDNA erfolgt bei 37°C für 60 Minuten im GeneAmp® PCR System 2400. Durch 7minütiges Erhitzen auf 95°C wurde die Reaktion beendet.

Zum Ausschluss einer Verunreinigung der mRNA durch DNA diente eine Negativkontrolle, in der die reverse Transkriptase durch DEPC-H₂O ersetzt wurde. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

PCR

In 100µl Tubes wurden jeweils 2µg cDNA in 50µl Reaktionsvolumen, bestehend aus 10% 10fach PCR-Puffer, 5% DMSO, 0,2mM dNTPs, 3 Units AmpliTaq® DNA-Polymerase und je 20pmol Sense- bzw. Antisense-Primer pipettiert. Die PCR-Reaktion wurde an einem GeneAmp® PCR System 2400 durchgeführt. Der initialen Denaturierung (94°C, 3 Minuten) folgten 40 Amplifizierungszyklen (Denaturierung bei 94°C für 1 Minute, Annealing bei je nach verwendeten Primern unterschiedlicher Temperatur für 1 Minute, Amplifizierung bei 72°C für 1 Minute). Die PCR wurde mit einem einmaligen Elongationsschritt bei 72°C für 10 Minuten abgeschlossen.

Unter Verwendung spezifischer Primer-Paare wurden ein 653nt Fragment der cDNA des murinen OSMRezeptors (nt 94–657; Genbank Accession AF058805) mit sense/antisense Primern von 24/23nt Länge, ein 689nt Fragment der cDNA von gp130 (nt 1863–2552;

Genebank Accession X62646) mit sense/antisense Primern von 24/23 nt Länge und ein 315 nt Fragment der cDNA des LIFRezeptors (nt 2618–2935; Genebank Accession NM_013584) mit sense/antisense Primern von jeweils 23 nt Länge generiert.

Als Annealing Temperatur wurde für die OSMR- und LIFR–Reaktion jeweils 56°C, für die gp130–Reaktion 58°C gewählt.

	Genbank Accession Number	Fragmen- länge	Sense-Primer	Antisense-Primer	Annealing Temperatur
OSMR Nukleotid 94-657	AF058805	563	5' AATGGCTTTCTC TGTGGTCCTTCA3'	5' CGTTCTACTCG GTAGGTACCTC3'	56°C
gp130 Nukleotid 1863–2552	X62646	689	5' CGTACACAGATG AAGGTGGGAAAG3'	5' CTCAGGCTGAC TGCAGTTCTGC3'	58°C
LIFR Nukleotid 2618–2935	NM_013584	315	5' GAGCATCCTTT GCTATCGGAAGC3'	5' CGTTATTTCT CCTCGATGATGG3'	56°C

Sequenzierung

Die entsprechenden Banden wurden aus einem 10%igen Agarose-Gel unter UV–Licht ausgeschnitten, mit QuiaexII® nach Anleitung des Herstellers (Quiagen) aufgereinigt und in den Vektor pCR2.1 legiert. Die Sequenzierung der DNA wurde durch die Firma Mediogenomix (München) durchgeführt.

2.2.3. Westernblot

Proteinextraktion

Y-1 Zellen und AtT-20 Zellen wurden in einer Dichte von $1,8 \times 10^6$ Zellen pro Gewebekulturschale (Durchmesser 10cm) in jeweils 8ml kompletten Wachstumsmedium ausgesät und unter den beschriebenen Bedingungen kultiviert. Nach 36 Stunden wurde das Zellkulturmedium durch 6ml serumfreies Medium (Hams F10, bzw. DMEM unter Zusatz von 0,1% endotoxinfreiem BSA und 2mM L-Glutamin) ersetzt. Nach 12 Stunden erfolgte ein erneuter Wechsel mit serumfreien Medium und die Zugabe der Zytokine in Konzentration von jeweils 10ng/ml (annähernd äquimolare Konzentrationen bei Molekulargewichten von 20 bis 22kDa). Proben wurden nach 2-, 5- und 10minütiger Inkubation gewonnen, indem das Medium abgesaugt, pro Gewebekulturschale 500µl Lysispuffer zugegeben, und die Gewebekulturplatten sofort für 10 Minuten auf Eis gestellt wurden. Der Lysispuffer wurde aus 50mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 100mM NaF, 2mM Natrium Othovanadat vorbereitet (pH 7,4) und 1% Triton X100, 1mM PMSF, 20 µM Leupeptin, 2µg/ml Aprotinin (2%) direkt vor der Proteinextraktion zubereitet. Nach der Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension mit Zellschabern vollständig von den Gewebekulturplatten gelöst und in sterilen Eppendorfgefäßen bei -20°C eingefroren.

Westernimmunoblot

Das Zelllysat wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und zentrifugiert, um überflüssige Zellbestandteile von den Proteinen abzutrennen.

Der proteinhaltige Überstand wurde im Verhältnis 1:2 mit Probenpuffer (0,1% DDT, 1% Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)) gemischt und zur Reduzierung der Proben für 5 Minuten auf

95°C aufgekocht. Jeweils 40µl der reduzierten Proben wurden auf ein 10%iges SDS Polyacrylamidgel aufgetragen. 1 bis 2stündige Laufzeit in einer Elektrophoresekammer nach dem SDS-PAGE System (Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese) bei 30mA führte zur Auftrennung der Proben nach deren Größe. Die Proben wurden durch Semidry–Westernblot-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert.

Für das Elektroblothing wurden 3 Lagen Whatman-3CHR-Filterpapier in Kathodenpuffer getränkt und auf die Kathoden-Elektrode gelegt, darauf das SDS-Gel und die mit Methanol aktivierte und in Anoden–II-Puffer äquilibrierte PVDF-Membran. Es folgten 2 Lagen Whatman-3CHR-Filterpapier mit Anoden–II-Puffer und eine 1 Lage Whatman-3CHR-Filterpapier mit Anoden–I-Puffer. Nach Anlegen der Anoden-Elektrode erfolgte der Transfer in 60 Minuten bei 2mA pro cm² Membranfläche. Anschließend wurde die Membran für 1 Stunde in einem 1,5%igen Tween20–PBS-Puffer (0,1M Phosphat, 0,15M NaCl, pH 7,5, 1,5% Tween20) unter Schütteln bei Raumtemperatur geblockt und über Nacht (16 Stunden) in passender Verdünnung mit Antikörpern gegen pStat-3 (1:40000), pStat-1 (1:10.000), pSTAT-5 (1:5000), cleaved PARP (1:1000) oder cleaved Caspase–3 (1:1000) in 1,5% PBS–Tween20–PBS-Puffer (0,5ml/cm²) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit einer 0,1%igen Tween20–PBS–Lösung wurde die Membran für 2 Stunden mit dem Peroxidase-konjugierten 2. Antikörper inkubiert. Dafür wurde ein polyklonaler POD-konjugierter Ziegen–Anti–Maus-Antikörper (Anti–pSTAT-3 als 1. Antikörper), bzw. ein polyklonaler POD-konjugierter Esel–Anti–Kaninchen-Antikörper (Anti–pSTAT-1–Antikörper (1:50000), Anti–cleaved–PARP, Anti–cleaved-Caspase–3 als 1. Antikörper (1:25000)) in 1,5%iger Tween20–PBS–Lösung verdünnt und für die Inkubation in einem Volumen von 0,5 ml/cm² zugegeben. Nach der 2. Antikörperreaktion wurde die Membran unter Schütteln dreimal mit 0,1%iger Tween20–PBS–Lösung gewaschen.

Die Detektion der immunreaktiven Banden erfolgte mittels Chemilumineszenz-Substrat (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrat). Dazu wurde die Membran für 30 Minuten mit 10-20 μ l/cm² der Chemilumineszenz-Lösung bedeckt.

Die Belichtung der Membran erfolgte auf einem XOMAT-AR®-Film für 5 Sekunden bis 16 Stunden.

Um zu verifizieren, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen worden waren, wurden die Membranen gestrippt und mit Antikörpern gegen die jeweiligen inaktiven (also nicht phosphorylierten, bzw. proteolytische gespaltenen) Proteine inkubiert. Zum Strippen wurden die Membranen für etwa 30 Minuten unter Schütteln in zwei verschiedene Waschlösungen gereinigt. Als erste Lösung wurde eine 2% SDS, 7M Urea-Lösung in destilliertem Wasser verwendet, als 2. Waschlösung eine 10%ige Essigsäure-Lösung. Nach Neutralisation der gestrippten Membran mit 1,5% Tween20-PBS-Puffer erfolgte wie beschrieben die Inkubation mit den Antikörpern gegen STAT-3 (1:40000), STAT-1 (1:10000), STAT-5 (1:5000), PARP (1:1000) oder Caspase-3 (1:1000).

2.2.4. Luciferase-Assay

Transfektion

AtT-20 Zellen wurden in einer Dichte von $0,3 \times 10^3$, Y-1 Zellen in einer Dichte von $0,35 \times 10^3$ pro Well einer 6-Loch-Gewebekulturplatten mit 2ml komplettem Zellkulturmedium ausgesät und 24 Stunden kultiviert. AtT-20 und Y-1 Zellen wurden mit einem murinem 2757/+929nt SOCS-3-Promotor-Luciferase-Konstrukt in einem pGL3Basic-Vektor, AtT-20 Zellen in einer weiteren Versuchsreihe mit einem -706/+64 Ratten POMC-Promoter-Luciferase-Konstrukt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Malcolm Low, Vollum Institute, Oregon, USA) transient transfiziert. Hierzu wurde ein kommerzieller Superfect® Transfektions-Kit nach Protokoll des Herstellers verwendet.

Zur Transfektion wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen 2µg des Plasmids pro Well in ein Zenrifugenröhrchen pipettiert und mit serumfreien DMEM-Medium auf 100µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Zu dieser DNA-Suspension wurden 10µl Superfect® Reagenz pipettiert, für circa 10 Sekunden geschüttelt (Vortex), und die Suspension bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Währenddessen wurde das Wachstumsmedium von den Zellen abgesaugt und die Zellen mit circa 1ml PBS-Lösung (37°C) gewaschen. Zu der DNA-Reagenz-Lösung wurden jeweils 600µl komplettes Medium pro 2µg DNA gegeben und die Suspension durch mehrmaliges Pipettieren vermischt. Je 710µl der fertig hergestellten DNA-Transfektionslösung wurden vorsichtig pro Well zugegeben. Die komplett mit der Lösung bedeckten Zellen wurden im Brutschrank 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung abgesaugt und die Zellen mit PBS (37°C) gewaschen. Es folgte eine 24stündige Wachstumsphase der AtT-20 Zellen mit je 2ml/Well kompletten Medium. Da die Y-1 Zellen mikroskopisch nach der Transfektion deutlich an Volumen und Differenzierung abgenommen hatten und in Vorversuchen nur geringe Transfektionsraten erreicht werden

konnten, wurde anstelle der 24stündigen eine 48stündige Regenerationsphase gewählt, wodurch sich die Zellmorphologie und die Transfektionsraten deutlich besserten. Nach der Regenerationsphase wurde das Zellkulturmedium durch 2ml serumfreies Medium (DMEM, bzw. HAMS-F10 unter Zusatz von 0,1% BSA und 2mM L-Glutamin) ersetzt und für 12 Stunden über Nacht belassen. Nach erneutem Wechsel des serumfreien Mediums wurden die jeweiligen Zytokine (10ng/ml) zugegeben. Nach 6stündiger Inkubation wurde das zytokinhaltige Medium von den Zellen abgesaugt, 210µl/Well Lysispuffer (1,25ml 1M Tris (pH 7,8), 7,5ml 87% Glycerol, 500µl 1M MgCl, 500µl TritonX 100, 100µl 0,5M EDTA (pH 8) aufgefüllt auf 50ml mit destilliertem Wasser) wurde zupipettiert und die Zellkulturplatten sofort für 10 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von den Gewebekulturplatten gelöst und die Zellsuspensionen in Eppendorf-Cups sofort bei -80°C eingefroren.

Messung

Da in den entsprechenden Konstrukten -706/+1641 POMC-luc und -2757/+929 SOCS-3-luc die Promotorregion für rPOMC, bzw. mSOCS3 der Region des Luciferase-Gens vorgeschaltet ist, bildet die Expression des Luciferase-Gens, welches als Reportergen bezeichnet wird, die Promotoraktivitäten der Gene für rPOMC, bzw. mSOCS-3 ab. Die Luciferase-Expression lässt sich durch luminometrische Bestimmung des von der Luciferase umgesetzten Luciferins bestimmen. Dazu wurden 10µl des auf Eis aufgetaute Zelllysates in Messröhrchen auf Eis pipettiert. Der Messpuffer (6,6ml Lysispuffer, 83µl 100mM ATP, 30µl 10mM Luciferin, aufgefüllt auf 10ml mit destilliertem Wasser) wurde im abgedunkelten Raum vor jeder Messung neu zubereitet, um eine Deaktivierung des Luciferins vor der Messung zu vermeiden. Zu den Proben wurde je 100µl Messpuffer zupipettiert und die Aktivität sofort bestimmt.

2.2.5. ACTH–Radioimmunassay

Versuchsaufbau

AtT–20 Zellen wurden in 6-Well Gewebekulturplatten in einer Konzentration von $0,3 \times 10^3$ pro well in 2ml komplettem DMEM Medium ausgesät und für 30 Stunden unter den beschriebenen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurde das Wachstumsmedium durch serumfreies Medium (DMEM unter Zusatz von 0,1% endotoxinfreiem BSA und 2mM L-Glutamin) ersetzt und für 12 Stunden über Nacht belassen. Das serumfreie Medium wurde vor der Stimulation erneuert und die jeweiligen Zytokine in Konzentration von 10,0ng/ml und ACTH in der Konzentration 10^{-7} M zugegeben. Nach 48stündiger Inkubation wurden die Zellüberstände abpipettiert und bei -80°C in Eppendorf–Cups eingefroren.

Messung

Die ACTH–Konzentration in den Zellüberständen wurde mit einem kommerziellen Radioimmunoassay der Firma Diagnostic System Laboratories (DSL) gemessen. Jeweils 50 μ l der Standards (ACTH-Standards zu 25, 125, 275, 600 und 1000pg/ml), der Kontrollen (ACTH-Kontrollen mit 70 ± 25 und 350 ± 105 pg/ml) und der Zellkulturüberstände wurden in 3,5ml–Messgefäße pipettiert. In jedes Messgefäß wurde 30 μ l ACTH–Antiserum zugegeben und der Inhalt vermischt (Vortex). Nach einer 4stündigen Inkubation bei 4°C wurden je 30 μ l ^{125}I –ACTH–Tracer zugegeben, gemischt (Vortex) und die Messproben bei 4°C für 24 Stunden inkubiert. Ein als „Total“ definierter Messwert enthielt 30 μ l Tracer, jedoch weder Probenvolumen noch ACTH–Antiserum, um die Aktivität des ^{125}I –ACTH–Tracers bestimmen zu können. Nach der Inkubationsphase wurden in jedes Probengefäß 250 μ l Präzippittierungslösung zugegeben, der Inhalt gemischt (Vortex) und 20 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 2000g für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Probenröhrchen mit 1ml Puffer (0,1% Tween20 in PBS) gewaschen und erneut bei 2000g für 20 Minuten zentrifugiert. Nach Dekantieren wurde die Radioaktivität des gebundenen ACTH-Tracers im Niederschlag bei einer 1minütigen Messzeit im Gamma-Counter bestimmt. Die ACTH-Konzentrationen im Zellkulturüberstand wurden anhand der Standardkurve mit dem Softwareprogramm Ria-Calc (Pharmacia) ermittelt.

2.2.6. Corticosteron–Radioimmunassay

Versuchsaufbau

Die Corticosteronspiegel wurden in Zellkulturüberständen von Y-1 Zellen nach Stimulation mit mLIF, hOSM und mOSM in Dosen von 0,1ng/ml gemessen. Als Vergleich dienten unstimulierte Kontrollzellen und mit ACTH (10^{-7} M) stimulierte Zellen. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Cortisosteronsekretion nach Stimulation mit mOSM dosisabhängig in Konzentrationen von 0,01 bis 1,0ng/ml (0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0ng/ml) und zeitabhängig zu unterschiedlichen Zeitpunkten (12, 24, 36 und 48h nach Zytokinzugabe) gemessen.

Y-1 Zellen wurden in 6-Well-Gewebekulturplatten in einer Konzentration von $0,35 \times 10^3$ pro well in 2ml komplettem Medium für 30 Stunden kultiviert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium durch serumfreies Medium (Hams-F10 unter Zusatz von 0,1% endotoxinfreiem BSA und 2mM L-Glutamin) ersetzt und für 12 Stunden über Nacht belassen. Vor der Stimulation wurde das serumfreie Medium erneuert und die Zytokine, bzw. ACTH zugegeben. Für den Dosis- und Zeitverlauf wurden nach 12, 24, 36 und 48 Stunden jeweils 100µl des Zellkulturüberstands abpipettiert und in Eppendorf-Cups bei -20°C eingefroren.

Für die Versuchsreihe mit 0,1ng/ml mLIF, mOSM und hOSM wurden jeweils 100µl des Überstandes nach 48stündiger Inkubationsdauer abgenommen und in Eppendorf-Cups bei -20°C eingefroren.

Messung

Die Messung der Corticosteronkonzentrationen erfolgte mittels eines Radioimmunassays der Firma ICN. Eine geometrische Verdünnungsreihe mit definierten Mengen unmarkierten Corticosteron von 0,009 bis 2,5ng/ml (gelöst in 0,1% BSA-PBS-Puffer mit 0,01% NaN₃, pH 7,0) wurde als Standardkurve erstellt. Als Ausgangslösung wurde exakt 1mg/ml Corticosteron eingewogen, auf 10ng/ml verdünnt und daraus alle Standardwerte durch Verdünnung gewonnen. Die 1. Antikörperlösung wurde aus 20ml Inkubationspuffer (1000ml PBS, 1g BSA, 0,1g NaN₃, pH 7,0), 100µl Kaninchen-Anti-Corticosteron-Antikörper (1.Antikörper, Verdünnung 1:200), 20µl Kaninchen-Gammaglobulin-Ausgangslösung (7µg/ml Kaninchen-Gammaglobulin und 200µl Phenolrot) hergestellt. Die Lösung wurde mittels Vortex gemischt und mindestens 30 Minuten vor Messbeginn angesetzt. Für die Präzipitierungslösung wurden 80ml 6%iger Polyethylenglycollösung (1000ml PBS, 60mg Polyethylenglycol 6000) 100µl Schaf-Anti-Kaninchen-Gammaglobulin (2.Antikörper, Verdünnung 1:800) zugegeben. Die Lösung wurde für mindestens 12 Stunden inkubiert, um eine ausreichende PEG-Antikörper-Komplexbildung zu gewährleisten. Jeweils 50µl der Standardverdünnungen, bzw. Zellüberstände, 50µl Corticosteron-Tracer und 50µl der 1.Antikörperlösung wurden in 3,5ml-Cups pipettiert und gemischt (Vortex). Nach 12stündiger Inkubation bei 4°C wurde jeweils 1ml der Präzipitierungslösung zugegeben, die Proben gemischt (Vortex) und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 2000g für 20 Minuten zentrifugiert. Der das freie Corticosteron enthaltende Überstand wurde durch Dekantieren verworfen. Im Gammacounter wurde die Radioaktivität des Niederschlages gemessen.

Anhand der Standardkurve konnte die Corticosteronmenge im Zellkulturüberstand mit dem Softwareprogramm Ria–Calc (Pharmacia) ermittelt werden. Damit die Werte der Proben im linearen Bereich der Eichkurve lagen (0,075ng/ml-1,25ng/ml), wurden Vormessungen mit Pools der jeweiligen Versuchsgruppen durchgeführt. Der daraus resultierende Verdünnungsfaktor wurde verwendet, um die Einzelproben zu messen.

2.2.7. Proliferationsassay

Versuchsaufbau

Y-1 Zellen wurden in einer Dichte von $0,3 \times 10^6$ in 6-Well-Gewebekulturplatten ausgesät. Nach einer initialen 24stündigen Wachstumsphase in komplettem Hams-F10 Medium wurden die Zellen erneut für 24 Stunden in serumfreien Hams-F10 Medium kultiviert. Anschließend wurden die entsprechenden Zusätze in frischem serumfreien Medium für weitere 24 Stunden zugegeben. Die einzelnen Untersuchungsgruppen wurden im Anschluss trypsiniert, dieser Vorgang mit Medium gestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellgruppen in gleichen Volumen resuspendiert, jeweils 100 Zellen der einzelnen Gruppen in 96-Well Platten ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Die colorimetrische Bestimmung vitaler Zellen erfolgte mit einem kommerziellen CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay nach Herstelleranweisung. Das Prinzip des Assays besteht in der Reduktion einer Tetrazolium-Komponente (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTS) zu einem farbigen Formazan-Produkt. Die Reduktion erfolgt durch vitale Zellen unter Verbrauch von NADPH oder NADH, welches von Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen produziert wird. Das in Medium lösliche Formazan-Produkt ist somit der Anzahl vitaler Zellen direkt

proportional und kann mittels ELISA bestimmt werden. Vier Stunden nach Zugabe der CellTiter 96® Aqueous One Solution wurde die Absorption bei 492nm in einem ELISA-Gerät bestimmt.

Es wurden folgende Versuchsreihen durchgeführt:

- I. Y-1 Zellen wurden mit mLIF, hOSM und mOSM (jeweils 10,0ng/ml) für 24 Stunden inkubiert.
- II. Y-1 Zellen wurden mit mOSM in aufsteigender Dosierung von 0,01 bis 10,0ng/ml für 24 Stunden inkubiert.
- III. Nach 30minütiger Vorinkubation mit dem JAK2-Inhibitor AG490 (100µM) wurde mOSM (10,0ng/ml) zugegeben und die Zellen für 24 Stunden inkubiert.
- IV. Y-1 Zellen wurden für 30 Minuten mit dem allgemeinen Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK (42µM) vorbehandelt und anschließend mit mOSM (10,0ng/ml) für 24 Stunden inkubiert.

2.2.8. Statistik

Zur Densitometrie der spezifischen Banden in den Westernblotstudien wurde das Computerprogramm NIH Image 1.59 verwendet.

Zur Analyse des paarweisen Vergleichs zwischen dem Mittelwert einer Versuchsgruppe und dem Mittelwert einer Kontrollgruppe, bzw. zwischen den Mittelwerten zweier Versuchsgruppen wurde der *Students t-test* verwendet. Die Werte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

Für die ACTH-Radioimmunassays wurden jeweils 3 unabhängige Versuche mit jeweils 4 Zellgruppen (n=12) durchgeführt. Für die Corticosteronassays wurden 4 unabhängige Versuche mit jeweils 6 Zellgruppen für den Dosis-/Zeitverlauf (n=24) und 3 unabhängige Versuche mit jeweils 5 Zellgruppen für den Vergleich zwischen den verschiedenen Zytokinen (n=15) durchgeführt. Für die SOCS-3 und POMC-Luciferaseassays und für die Proliferationsassays wurden jeweils 3 unabhängige Versuche mit jeweils 3 Zellgruppen (n=9) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Effekte von OSM an corticotrophen AtT-20 Zellen

3.1.1. Expression der funktionellen Rezeptoruntereinheiten gp130, LIFR und OSMR in corticotrophen AtT-20 Zellen und murinem Hypophysengewebe

Die Expression der Rezeptoruntereinheiten gp130 und LIFR konnte durch RT-PCR in mRNA von corticotrophen AtT-20 Zellen und primären Hypophysengewebe (C57BI6 Mäuse) nachgewiesen werden (Abb.8). Ein 689nt Fragment der murinen gp130 cDNA (nt1863–2552, Genebank Accession X62646) und ein 315nt Fragment der murinen LIFR cDNA (nt2618-2935, Genebank Accession NM_013584) wurden generiert. Die Detektion der OSMR–Untereinheit cDNA durch ein 563nt Fragment (nt94–657, Genebank Accession AF058805) gelang in murinen Hypophysengewebe, nicht jedoch in AtT-20 Zellen. Die entsprechenden aus einer Agarplatte ausgeschnittenen, aufgereinigten und in den Vektor pCR2.1 klonierten Banden wurden zur Verifizierung sequenziert.

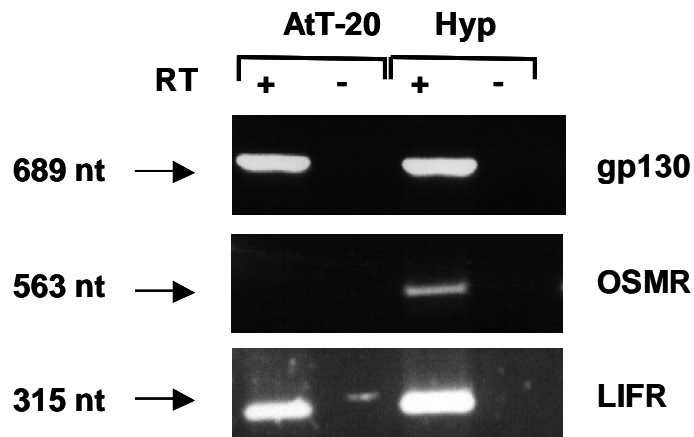


Abb. 8: Expression der funktionellen Rezeptoruntereinheiten gp130, OSMR und LIFR in corticotropen AtT-20 und in primären Hypophysengewebe von C57Bl6 Mäusen

RT-PCR-Nachweis eines 689nt Fragment der murinen gp130 cDNA (nt 1863–2552, Genbank Accession X62646) und eines 315nt Fragment der murinen LIFR cDNA (nt 2618–2935, Genbank Accession NM_013584) in murinen AtT-20 Zellen und in murinem Hypophysengewebe. RT-PCR-Nachweis eines 563nt Fragments der murinen OSMR cDNA (nt 94–657, Genbank Accession AF058805) in murinem Hypophysengewebe, jedoch nicht in murinen AtT-20 Zellen.

3.1.2. Tyrosinphosphorylierung von STAT-3 und STAT-1 in corticotropen AtT-20 Zellen durch mLIF, mOSM und hOSM

Um die Aktivierung der Jak-STAT-Kaskade als intrazellulären Signalweg von Oncostatin M in AtT-20 Zellen nachzuweisen, wurde die Tyrosinphosphorylierung von STAT-3 und STAT-1 nach 5- und 10minütiger Inkubation mit mLIF, mOSM und hOSM in Konzentrationen von 10,0ng/ml untersucht. Während mLIF und hOSM die Phosphorylierung von STAT-3 und STAT-1 zu beiden Zeitpunkten deutlich stimulierten, führte mOSM zu keiner Phosphorylierung von STAT-3 und STAT-1 (Abb.9). Somit konnte keine Aktivierung der Jak-STAT-Kaskade durch murines OSM in AtT-20 Zellen nachgewiesen werden.

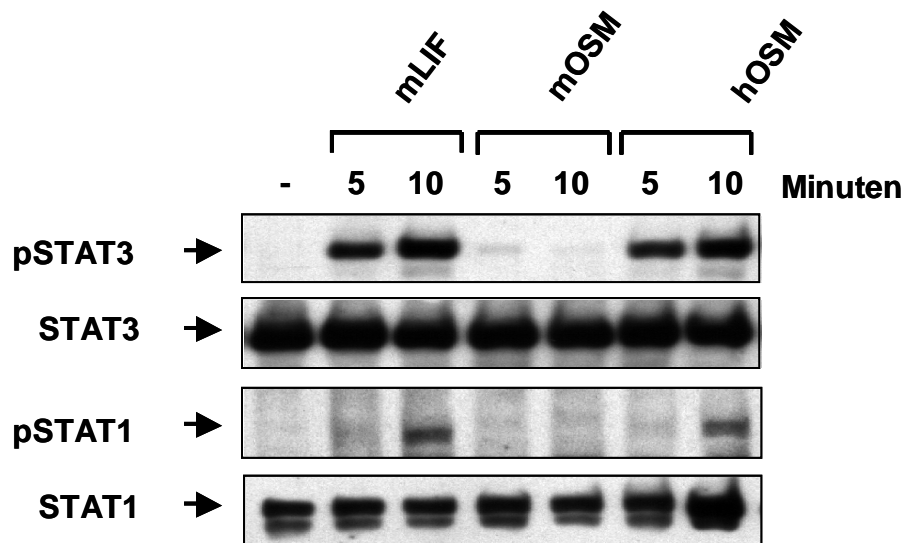


Abb. 9: Tyrosinphosphorylierung von STAT-3 und STAT-1 in corticotropen AtT-20 Zellen

Der Nachweis phosphorylierter STAT-3 und STAT-1 Proteine erfolgte nach Stimulation mit mLIF und hOSM (jeweils 10,0ng/ml). Eine STAT-Aktivierung durch mOSM konnte nicht beobachtet werden. Durch Verwendung von Antikörpern gegen STAT-3 und STAT-1 wurde gezeigt, dass gleich Mengen der Proben aufgetragen wurden.

3.1.3. SOCS-3 Genexpression in corticotrophen AtT-20 Zellen durch mLIF, mOSM und hOSM

Um die STAT-abhängige Genexpression von SOCS-3 durch Oncostatin M nachzuweisen, wurde die Promotoraktivität eines murinen -2757/+929 SOCS-3-Promotor-Luciferase-Konstrukts in AtT-20 Zellen nach Stimulation mit mLIF, mOSM und hOSM (jeweils 10,0ng/ml) untersucht. Während die Aktivität des SOCS-3 Promotors durch mLIF signifikant auf das $7,2 \pm 1,3$ -fache ($p < 0,001$) und durch hOSM auf das $7,5 \pm 1,8$ -fache ($p < 0,001$) des Kontrollwertes angehoben wurde, führte die Stimulation mit mOSM zu keinem signifikanten Anstieg (Abb.10).

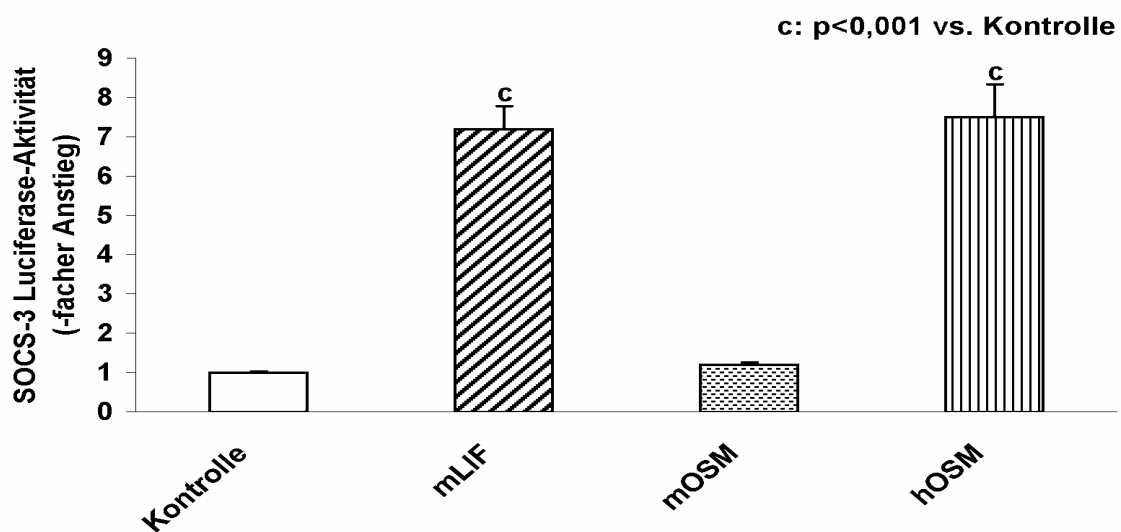


Abb. 10: Promotoraktivität eines murinen -2757/+929 SOCS-3-Promotor-Luciferase-Konstrukts in corticotrophen AtT20-Zellen

AtT-20 Zellen wurden transient mit einem murinen -2757/+929 SOCS-3-Promotor-Luciferase-Konstrukt transfiziert und mit mLIF, mOSM und hOSM (jeweils 10,0ng/ml) für 6 Stunden inkubiert. Die Promotoraktivität der stimulierten Zellen wurde im Verhältnis zur Promotoraktivität unstimulierter Kontrollzellen gesetzt. Während mLIF und hOSM einen signifikanten Anstieg der Promotoraktivität bewirkten, führte mOSM zu keiner signifikanten Aktivierung der SOCS-3 Genexpression.

3.1.4. POMC Genexpression in corticotrophen AtT-20 Zellen durch mLIF, mOSM und hOSM

Um die STAT-abhängige Genexpression von Proopiomelanocortin (POMC) durch OSM zu belegen, wurde die Promotoraktivität eines -706/+64 POMC-Promotor-Luciferase-Konstrukts (Ratte) in AtT-20 Zellen nach Stimulation mit mLIF, hOSM und mOSM (jeweils 10,0 ng/ml) untersucht. Während mLIF und hOSM die Promotoraktivität signifikant auf das $2,9 \pm 0,8$ -fache ($p < 0,001$), bzw. $3,0 \pm 0,8$ -fache ($p < 0,001$) des Kontrollwertes steigerten, bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Promotoraktivität der mit mOSM stimulierten Zellen und der Kontrollgruppe (Abb.11).

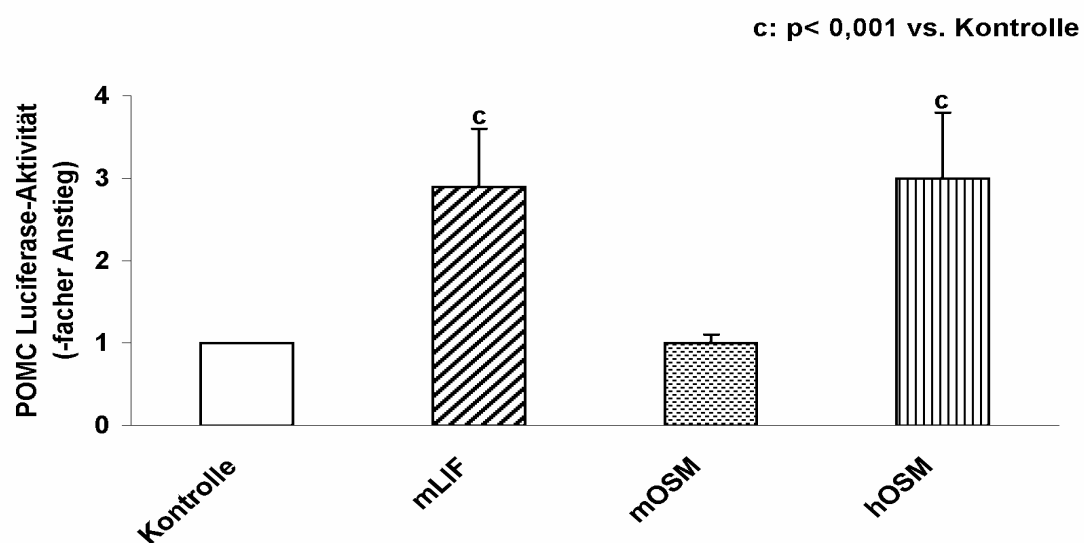


Abb. 11: Promotoraktivität eines -706/+64 Ratten POMC-Promoter-Luciferase-Konstrukts in corticotrophen AtT20-Zellen

AtT-20 Zellen wurden transient mit einem -706/+64 Ratten POMC-Promotor-Luciferase-Konstrukt transfiziert und mit mLIF, mOSM und hOSM (jeweils 10,0ng/ml) für 6 Stunden inkubiert. Die Promotoraktivität der stimulierten Zellen wurde im Verhältnis zur Promotoraktivität unstimulierter Kontrollzellen gesetzt. Während mLIF und hOSM einen signifikanten Anstieg der Promotoraktivität bewirkten, führte mOSM zu keiner signifikanten POMC Aktivität.

3.1.5. ACTH-Sekretion corticotropher AtT-20 Zellen durch mLIF, mOSM und hOSM

Um eine zytokinvermittelte Stimulation der STAT-abhängigen ACTH-Sekretion durch AtT-20 Zellen zu belegen, wurden die Zellen für 48 Stunden mit mLIF, mOSM und hOSM (jeweils 10,0ng/ml) inkubiert und die ACTH-Konzentrationen mittels Radioimmunassay im Zellüberstand bestimmt. Die Stimulation mit mLIF und hOSM führte zu einem signifikanten Anstieg der ACTH-Sekretion auf das $1,7 \pm 0,4$ ($p < 0,001$), bzw. $1,7 \pm 0,5$ -fache ($p < 0,001$) des Kontrollwertes, während mOSM eine $1,3 \pm 0,2$ -fache und somit nicht signifikante Stimulation der ACTH Sekretion bewirkte (Abb.12).

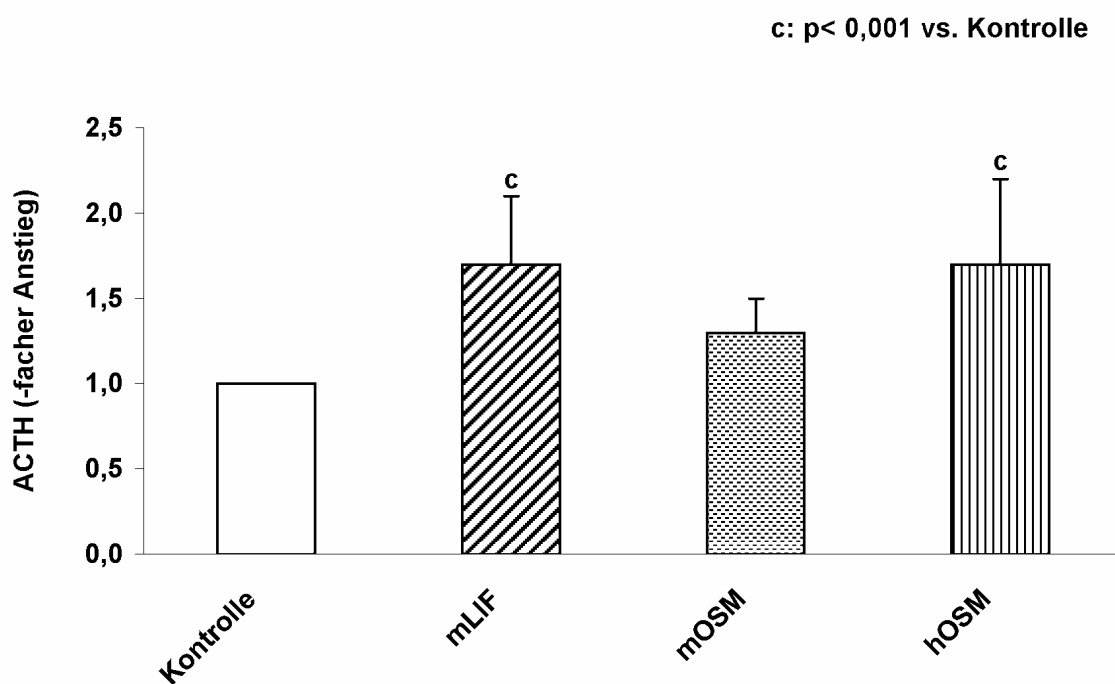


Abb. 12: ACTH-Sekretion durch corticotrophe AtT-20 Zellen

Die ACTH-Sekretion wurde im Überstand von AtT-20 Zellen nach Stimulation mit jeweils mLIF, hOSM und mOSM (jeweils 10,0ng/ml) für 48 Stunden bestimmt. Während die Inkubation mit mLIF und hOSM zu einem signifikanten Anstieg der ACTH-Sekretion im Vergleich mit der unstimulierten Kontrollgruppe führte, zeigte mOSM keinen signifikanten Effekt auf die ACTH-Ausschüttung von AtT-20 Zellen

3.2. Effekte von mOSM an adrenocorticalen Y-1 Zellen

3.2.1. Expression der funktionellen Rezeptoruntereinheiten gp130, LIFR und OSMR in adrenocorticalen Y-1 Zellen und murinem Nebennierengewebe

Durch RT-PCR konnte die Expression der Rezeptoruntereinheiten gp130, LIFR und OSMR in mRNA von murinen adrenocorticalen Y-1 Zellen und von primären Nebennierengewebe (C57BI6 Mäuse) nachgewiesen werden.

Ein 563nt Fragment der murinen OSMR cDNA (nt94-657, Genebank Accession AF058805), ein 689nt Fragment der murinen gp130 cDNA (nt1863-2552, Genebank Accession X62646) and ein 315nt Fragment der murinen LIFR cDNA (nt2618-2935, Genebank Accession NM_013584) konnten durch RT-PCR detektiert werden (Abb.13). Die entsprechenden, aus Y-1 mRNA gewonnenen Banden wurden aus einem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt, in den Vektor pCR2.1 kloniert und sequenziert, um ihre Spezifität zu belegen.

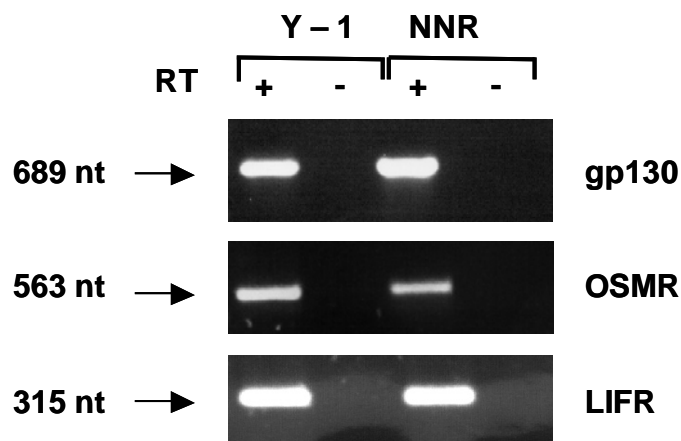


Abb. 13: Expression der funktionellen Rezeptoruntereinheiten gp130, OSMR und LIFR in adrenocorticalen Y-1 Zellen und in primären Nebennierengewebe von C57BI6 Mäusen

RT-PCR-Nachweis eines 689nt Fragment der murinen gp130 cDNA (nt 1863-2552, Genebank Accession X62646), eines 563nt Fragments der murinen OSMR cDNA (nt 94-657, Genebank Accession AF058805) und eines 315nt Fragment der murinen LIFR cDNA (nt 2618-2935, Genebank Accession NM_013584) in murinen Y-1 Zellen und in murinem Nebennierengewebe.

3.2.2. Tyrosinphosphorylierung von STAT-3, STAT-1 und STAT-5 in adrenocorticalen Y-1 Zellen durch mLIF, mOSM und hOSM

Die Tyrosinphosphorylierung von STAT-3, STAT-1 und STAT-5 wurde in Y-1 Zellen nach 5-, bzw. 10minütiger Inkubation mit mLIF, mOSM und hOSM (jeweils 10,0ng/ml) untersucht. Alle drei Zytokine führten deutlich zur Phosphorylierung von STAT-3 und STAT-1 zu beiden Zeitpunkten, wobei mOSM die Phosphorylierung von STAT-1 am potentesten stimulierte.

Murines OSM, nicht aber LIF oder humanes OSM führte zudem zur Tyrosinphosphorylierung von STAT-5 (Abb.14).

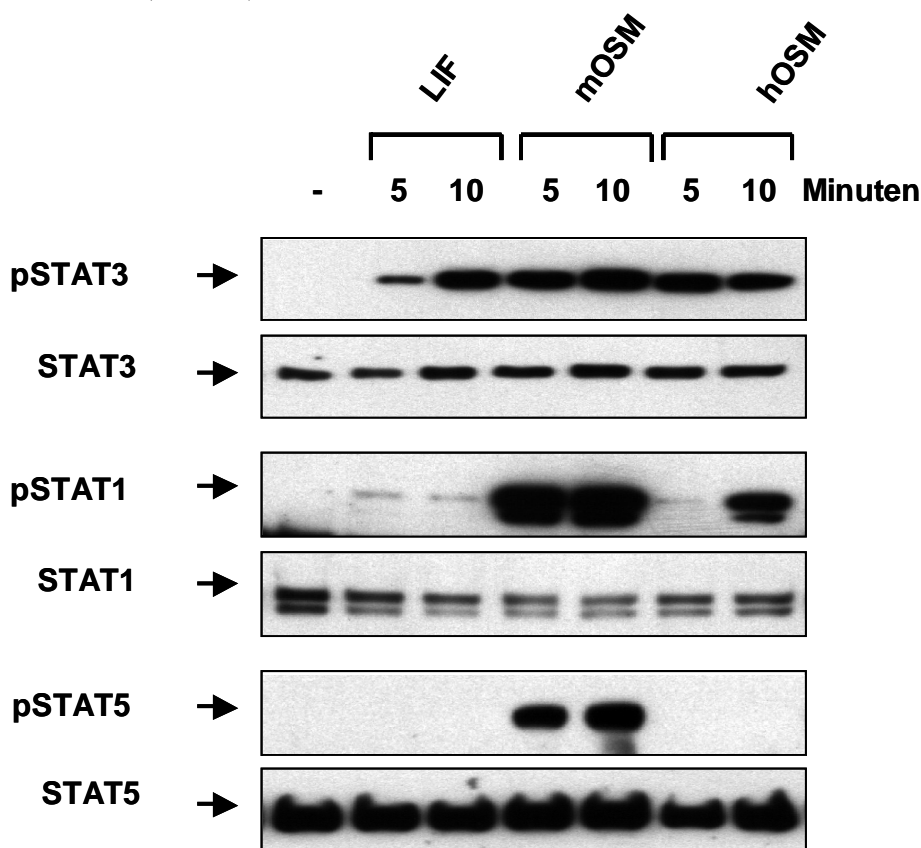


Abb. 14: Tyrosinphosphorylierung von STAT-3, STAT-1 und STAT-5 in adrenocorticalen Y-1 Zellen

Der Nachweis phosphorylierter STAT-3, STAT-1 und STAT-5 Proteine erfolgte nach Stimulation mit mLIF, mOSM und hOSM (jeweils 10,0ng/ml) durch Verwendung spezifischer Antikörper. Während mLIF, mOSM und hOSM zur Aktivierung von STAT-3 und STAT-1 führen, ist eine Phosphorylierung von STAT-5 ausschließlich durch mOSM zu beobachten. Durch Verwendung von Antikörpern gegen STAT-3, STAT-1 und STAT-5 wurde gezeigt, dass gleich Mengen Proben aufgetragen wurden.

3.2.3. SOCS-3 Genexpression in adrenocorticalen Y-1 Zellen durch mLIF, hOSM und mOSM

Nach Stimulation mit mLIF, mOSM und hOSM (jeweils 10,0ng/ml) wurde die STAT-abhängige Promotor-Aktivität eines murinen -2757/+929 SOCS-3-Promotor-Luciferase-Konstrukts in Y-1 Zellen untersucht.

Durch alle drei Zytokine konnte ein signifikanter Anstieg der Promotor-Aktivität beobachtet werden. Murines LIF führte zu einem Anstieg auf das $1,9 \pm 0,1$ -fache ($p < 0,001$), mOSM auf das $4,5 \pm 0,3$ -fache ($p < 0,001$) und hOSM auf das $2,2 \pm 0,2$ -fache ($p < 0,001$) des unstimulierten Kontrollwertes (Abb.15).

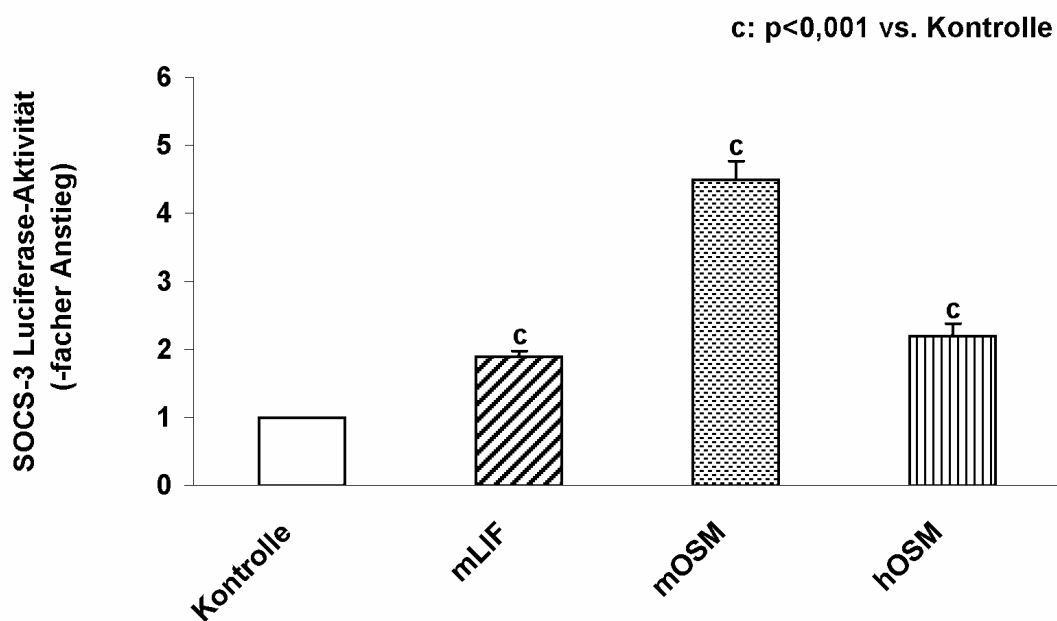


Abb. 15: Promotoraktivität eines murinen -2757/+929 SOCS-3-Promotor-Luciferase Konstrukts in adrenocorticalen Y-1 Zellen

Y-1 Zellen wurden transient mit einem murinen -2757/+929 SOCS-3-Promotor-Luciferase-Konstrukt transfiziert und mit mLIF, mOSM und hOSM (jeweils 10,0ng/ml) für 6 Stunden inkubiert. Die Promotoraktivität der stimulierten Zellen wurde im Verhältnis zur Promotoraktivität unstimulierter Kontrollzellen gesetzt. Sowohl mLIF und hOSM, als auch mOSM bewirkten einen signifikanten Anstieg der Promotoraktivität.

3.2.4. Steroidsekretion adrenocorticaler Y-1 Zellen durch mLIF, mOSM und hOSM

Zum Nachweis eines stimulierenden Effekts von murinem OSM auf die Steroidsekretion adrenocorticaler Zellen wurden Y-1 Zellen mit jeweils 1,0ng/ml mOSM, mLIF und hOSM stimuliert und die Steroidsekretion in den Zellkulturüberständen in einem Radioimmunassay nach 48h gemessen. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Y-1 Zellen, die Positivkontrolle bildete eine Gruppe von Y-1 Zellen, die mit ACTH (10^{-7} M) stimuliert wurde. ACTH führte zu einem Anstieg der Steroidsekretion auf das $2,4 \pm 0,4$ -fache der unstimulierten Kontrollgruppe ($p < 0,01$), mOSM auf das $3,7 \pm 0,9$ -fache ($p < 0,01$), hOSM auf das $2,0 \pm 0,2$ -fache ($p < 0,01$) und mLIF auf das $2,5 \pm 0,3$ -fache ($p < 0,01$). Alle drei Zytokine konnten die Steroidausschüttung signifikant anheben. Die potenteste Stimulation wurde durch mOSM erreicht, sie lag signifikant über der Stimulation durch mLIF ($p < 0,05$) und hOSM ($p < 0,05$) (Abb.16).

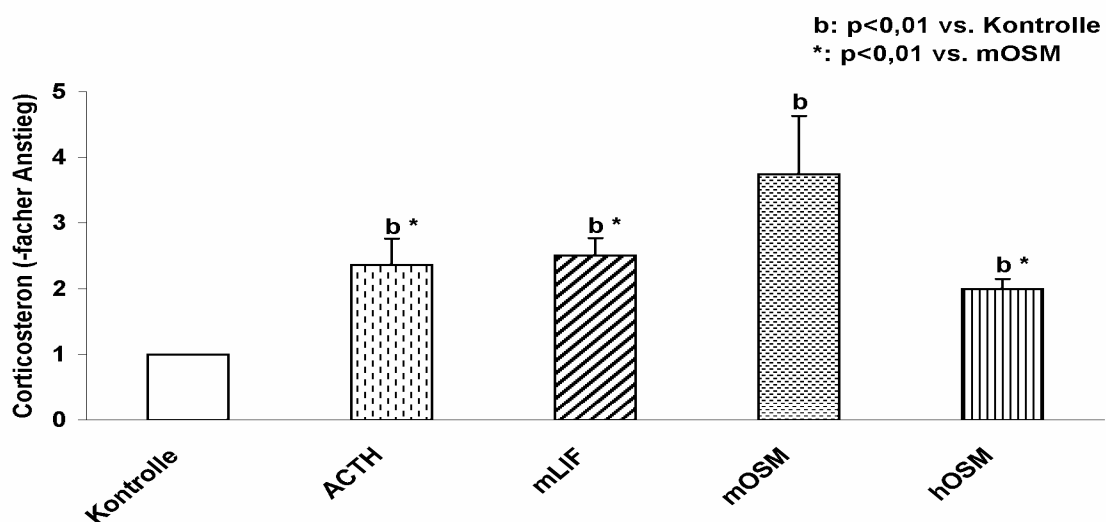


Abb. 16: Steroidsekretion durch adrenocorticale Y-1 Zellen

Steroidsekretion nach Stimulation mit mLIF, hOSM und mOSM (1,0ng/ml). mLIF, mOSM und hOSM führten zu einem signifikanten Anstieg der Steroidsekretion im Vergleich mit der unstimulierten Kontrollgruppe, wobei der Anstieg der Steroidsekretion durch mOSM signifikant höher war als der durch mLIF und hOSM induzierte Anstieg. ACTH diente als Positivkontrolle.

Die Stimulation der Steroidsekretion durch mOSM wurde in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Stimulationsdosis untersucht. Dazu wurden Y-1 Zellen mit mOSM in aufsteigenden Konzentrationen von 0,01 bis 1,0ng/ml stimuliert und die Steroidsekretion nach 12, 24, 36 und 48 Stunden im Zellkulturüberstand bestimmt. Die Stimulation der Steroidausschüttung erwies sich als zeit- und dosisabhängig (Abb. 17). Durch Koinkubation von ACTH (10^{-7} M) und mOSM wurden additive Effekte erzielt.

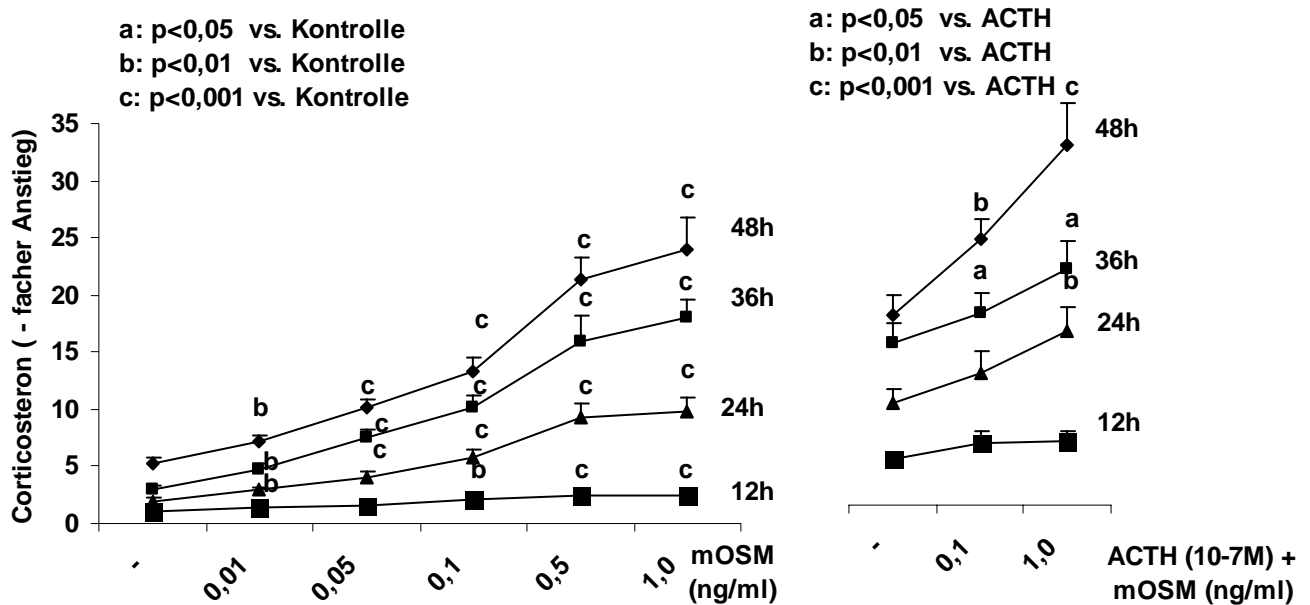


Abb. 17: Zeit- und dosisabhängiger Verlauf der Steroidsekretion durch adrenocorticale Y-1 Zellen

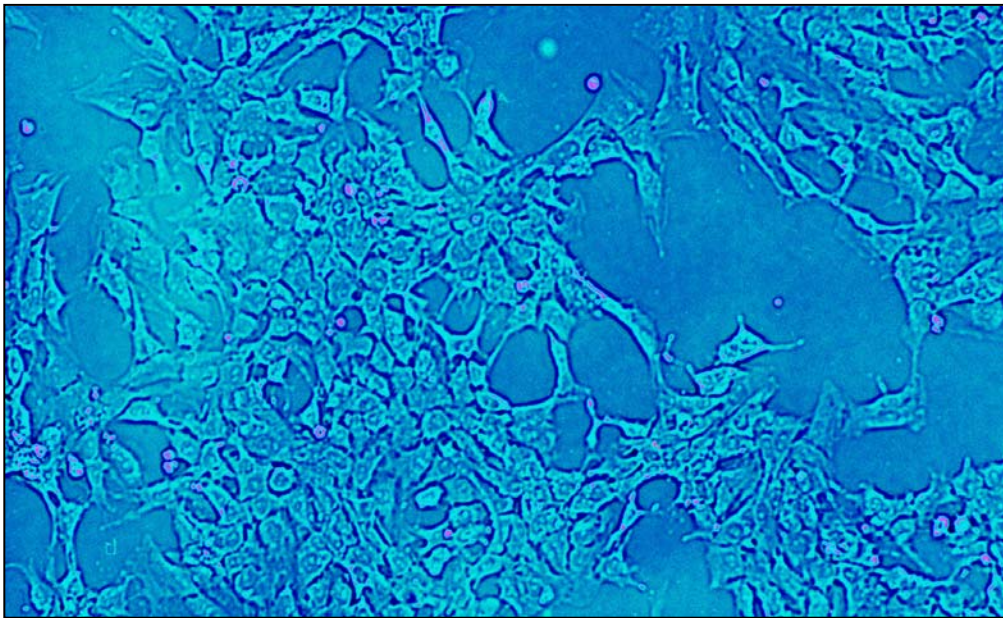
Die Stimulation der Steroidsekretion durch mOSM erwies sich als abhängig von der Inkubationsdosis und der Inkubationsdauer. Koinkubation mit ACTH und OSM führte zu additiven Effekten.

3.2.5. Wirkung von Oncostatin M auf die Morphologie und Anzahl vitaler adrenocorticaler Y-1 Zellen

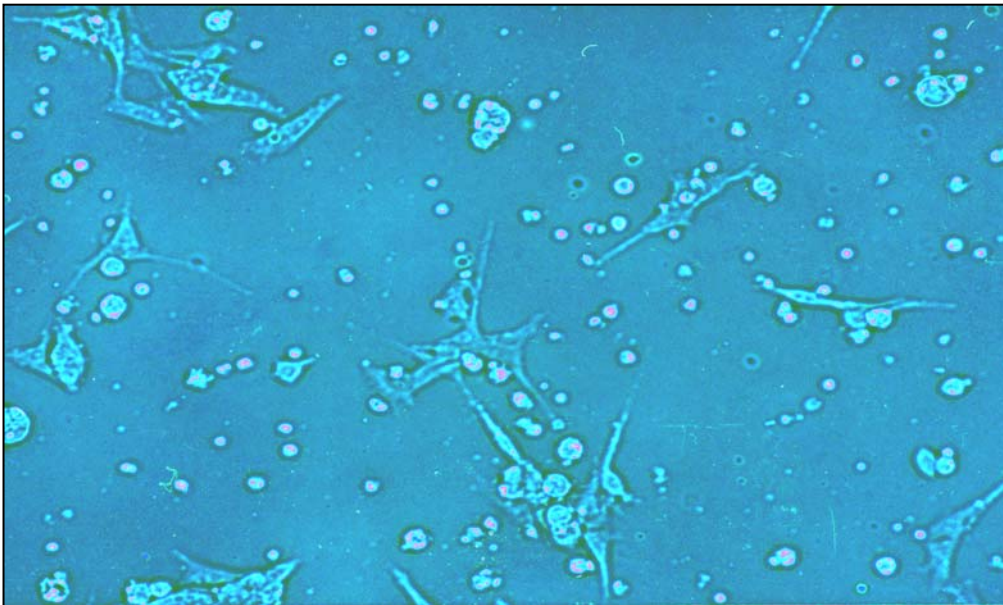
3.2.5.1. Morphologische Veränderungen adrenocorticaler Y-1 Zellen durch mOSM

Während die unstimulierten Kontrollzellen im Verlauf der beschriebenen Experimente adhären an den Gewebekulturplatten waren, fielen bei den mit mOSM (1,0ng/ml und höhere Konzentrationen) inkubierten Zellen nach etwa 12 Stunden eine deutliche Änderung der Zellmorphologie und Zellhaftung auf; nach 24 bis 48 Stunden hatten sich annähernd alle Zellen von der Zellkulturplatte abgelöst. Der beobachtete Effekt war sowohl zell-, als auch zytokinspezifisch. So führten gleiche Konzentrationen von murinem OSM an anderen Zelllinien, z.B. an murinen AtT-20 Zellen, zu keiner lichtmikroskopisch wahrnehmbaren Veränderung. Auch die Inkubation von Y-1 Zellen mit anderen Zytokinen der gp130-Gruppe, z.B. IL-6, IL-11, hOSM oder mLIF führte zu keiner signifikanten Veränderung der Zellmorphologie. Zur Dokumentation wurden drei verschiedene Zellgruppen fotografiert: eine unstimulierte Kontrollgruppe, eine mit 10,0ng/ml mOSM inkubierte Gruppe von Y-1 Zellen und eine Zellgruppe, die vor der Inkubation mit 10,0ng/ml mOSM mit dem allgemeinen Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK (42µM) für 30 Minute vorbehandelt worden ist (Abb.18). Während die unstimulierten Zellen nach 48 Stunden weiterhin differenziert waren und fest an der Gewebekulturplatte hafteten, waren die mit mOSM stimulierten Y-1 Zellen weitgehend entdifferenziert und vom Boden abgelöst; ein eindeutiger Zellverbund zwischen den einzelnen Y-1 Zellen ließ sich nicht mehr erkennen. Hingegen waren keine signifikanten morphologischen Veränderungen zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe und den mit dem allgemeinen Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK vorinkubierten und anschließend mit mOSM inkubierten Y-1 Zellen erkennbar.

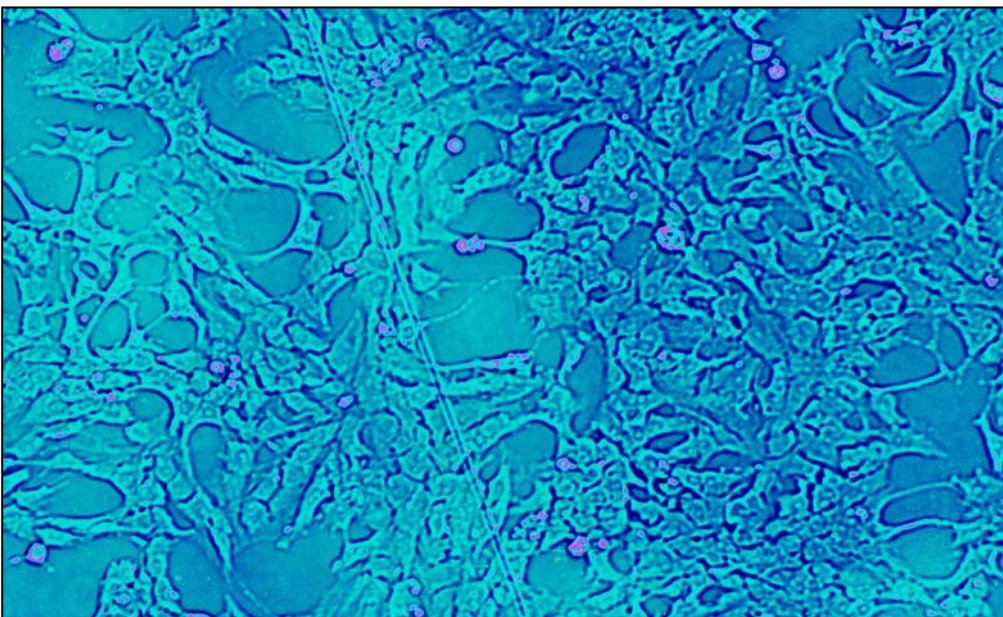
Der Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK bindet an definierte Aminosäuresequenzen der Caspasen-1 und -3, schützt sie vor proteolytischer Spaltung, und verhindert somit ihre Aktivierung, wodurch der Vorgang der Apoptose an entscheidender Stelle unterbrochen wird. Die Tatsache, dass die Vorinkubation mit dem Caspase-Inhibitor die Y-1 Zellen vor dem Untergang durch mOSM bewahren konnte, impliziert, dass es sich bei dem beobachteten Zelluntergang um Apoptose handelt.



A



B



C

Abb. 18: Morphologische Veränderungen adrenocorticaler Y-1 Zellen durch mOSM A: Unstimulierte Y-1 Zellen. B: nach 48stündiger Inkubation mit mOSM (10,0ng/ml). C: nach 30minütiger Vorinkubation mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK und anschließender 48stündiger Inkubation mit mOSM (10,0 ng/ml).

3.2.5.2. Negativer Effekt von mOSM auf die Zahl vitaler adrenocorticaler Y-1 Zellen

Zur Objektivierung und Quantifizierung der beobachteten morphologischen Veränderungen wurden Proliferationsassays durchgeführt. Die Zellzahl der unstimulierten Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Um einen möglichen toxischen Einfluss von DMSO, in dem Z-VAD-FMK nach Empfehlung des Herstellers aufgelöst wurde, auszuschließen, wurde die Proliferation jeweils einer Kontrollgruppe und einer mit mOSM stimulierten Zellgruppe, der zusätzlich DMSO zugegeben wurde, gemessen. Die Ergebnisse ergeben sich aus dem Mittelwert von zehn unabhängigen Versuchen. Folgende Versuchsreihen wurden durchgeführt:

- I. Um die Spezifität der Proliferationshemmung von Y-1 Zellen durch murines Oncostatin M nachzuweisen, wurden Y-1 Zellen mit mLIF, mOSM oder hOSM (jeweils 10,0ng/ml) stimuliert und die Anzahl vitaler Y-1 Zellen nach 24stündiger Inkubation und anschließender 24stündiger Wachstumsphase mit der einer unstimulierten Kontrollgruppe verglichen. Dabei konnte weder bei den mit mLIF stimulierten Y-1 Zellen (80 ± 19 vs. 100%) noch bei den mit hOSM stimulierten Y-1 Zellen (81 ± 15 vs. 100%) eine signifikante Änderung der Zellzahl gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden. Hingegen fiel die Zellzahl in der mit mOSM stimulierten Gruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ab (37 ± 3 vs. 100%; $p < 0,001$) (Abb.19).

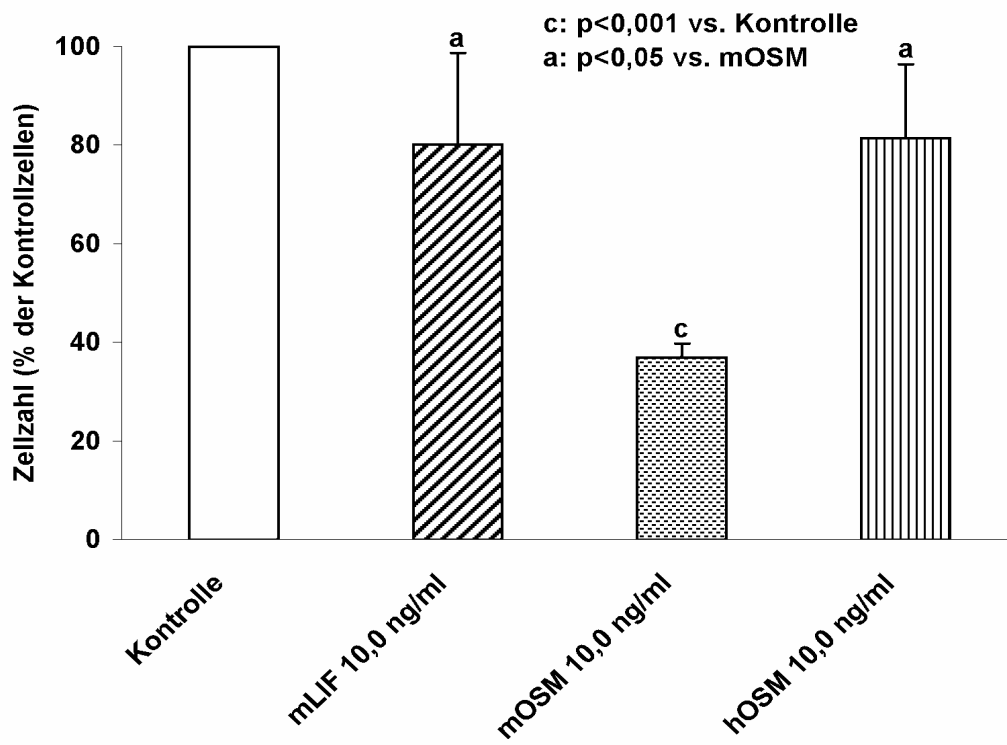


Abb. 19: Reduktion vitaler Y-1 Zellen nach Stimulation mit mOSM

Durch Stimulation mit mOSM (10,0ng/ml) kam es zu einem signifikanten Abfall vitaler Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe. Durch Stimulation mit mLIF und hOSM (jeweils 10,0ng/ml) hingegen konnte kein signifikante Veränderung der Zellzahl beobachtet werden.

II. Der negative Effekt von mOSM auf die Anzahl vitaler Y-1 Zellen erwies sich als dosisabhängig. Die 24stündige Stimulation mit mOSM in Dosierungen von 0,01, 0,1, 1,0 und 10,0ng/ml führte zu einer Abnahme der vitalen Zellen auf $99 \pm 2\%$, $84 \pm 9\%$, $50 \pm 7\%$ und $43 \pm 5\%$ gegenüber den unstimulierten Kontrollzellen (100%), wobei die Änderung der Zellzahl durch Stimulation mit 1,0ng/ml (50 ± 7 vs. 100%; $p < 0,01$) und mit 10,0ng/ml (43 ± 5 vs. 100%; $p < 0,001$) signifikant war (Abb.20).

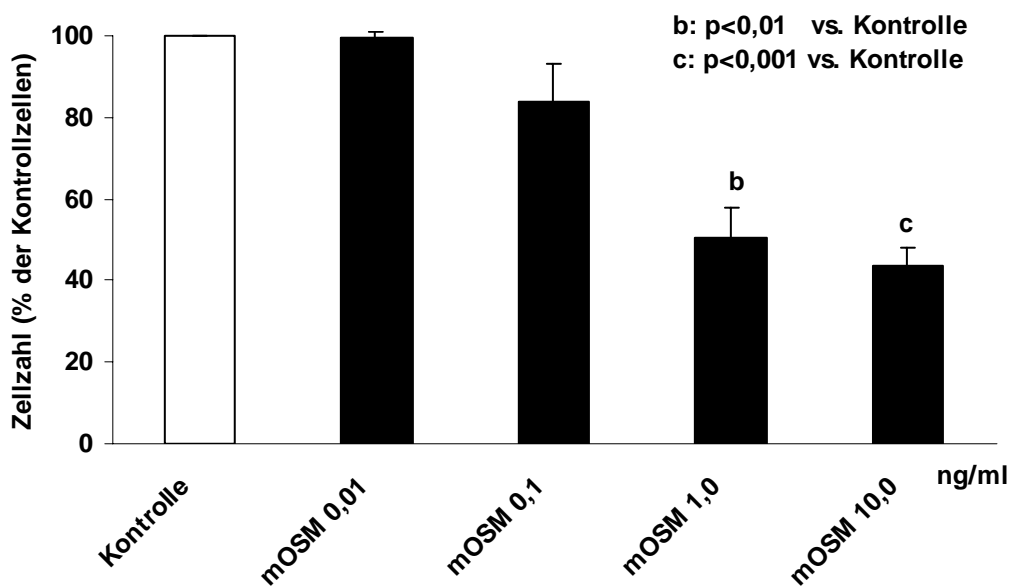


Abb. 20: Dosisabhängige Reduktion vitaler Y-1 Zellen nach Stimulation mit mOSM

Die Reduktion vitaler Y-1 Zellen nach 24stündiger Stimulation mit mOSM erwies sich als dosisabhängig. Inkubation mit 1,0 und 10,0ng/ml mOSM führte zu einem signifikanten Abfall der Zellzahl im Vergleich mit der unstimulierten Kontrollgruppe.

III. Vorinkubation der Y-1 Zellen mit dem spezifischen Jak2-Inhibitor AG490 (100 μ M) vor Stimulation mit mOSM (10,0ng/ml) konnte den mOSM-induzierten negativen Effekt auf die Zellzahl nahezu komplett unterdrücken. Während die Anzahl vitaler Zellen durch 24stündige Inkubation mit 10,0ng/ml mOSM signifikant auf $53 \pm 7\%$ gegenüber der Kontrollgruppe absank, betrug sie bei den vor der Stimulation für 30 Minuten mit AG490 vorinkubierten Zellen $86 \pm 4\%$ und unterschied sich damit nicht signifikant von den unstimulierten Kontrollzellen ($p < 0,001$ vs. mOSM). Alleinige Inkubation mit AG490 (100 μ M) ohne anschließende Stimulation mit mOSM hatte keinen Einfluss auf die Anzahl vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (94 ± 3 vs. 100 %) (Abb.21).

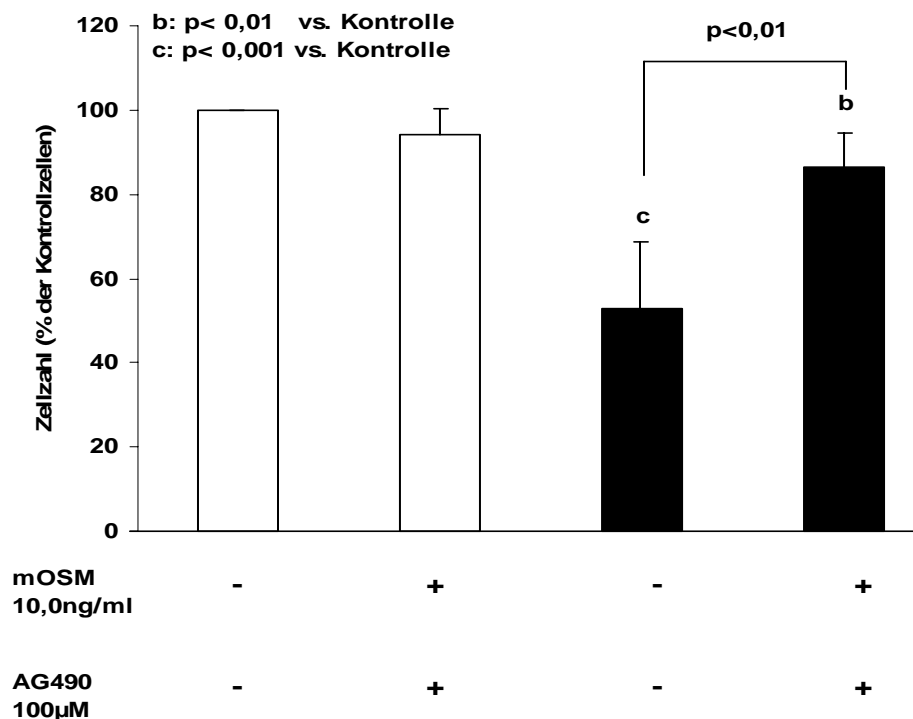


Abb. 21: Aufhebung des negativen Effekts von mOSM auf die Anzahl vitaler Y-1 Zellen durch den Jak2-Inhibitor AG490

Nach 24stündiger Inkubation mit mOSM (10,0ng/ml) kam es zu einem signifikanten Abfall vitaler Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe. 30minütige Vorinkubation mit dem Jak2- Inhibitor

AG490 (100 μ M) vor Stimulation mit mOSM (10,0ng/ml) konnte den negativen Effekt beinahe komplett unterdrücken.

IV. Der negative Effekt von mOSM auf die Anzahl vitaler Y-1 Zellen konnte durch Vorinkubation mit dem allgemeinen Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK (42 μ M) vor Stimulation der Y-1 Zellen mit mOSM (10,0ng/ml) nahezu komplett verhindert werden. Während die Anzahl vitaler Zeller nach 24stündiger Inkubation mit mOSM (10,0ng/ml) signifikant gegenüber den Kontrollzellen absank (65 ± 3 vs. 100%; $p < 0,001$), entsprach sie in der mit Z-VAD-FMK vorbehandelten Zellgruppe in etwa den Kontrollzellen (92 ± 6 vs. 100%, nicht signifikant) (Abb.22). Somit ergab sich eine signifikante Differenz der Zellzahl in der mit mOSM stimulierten und der mit dem Caspase-Inhibitor vorbehandelten Versuchsgruppe (65 ± 3 vs. 92 ± 6 %; $p < 0,001$).

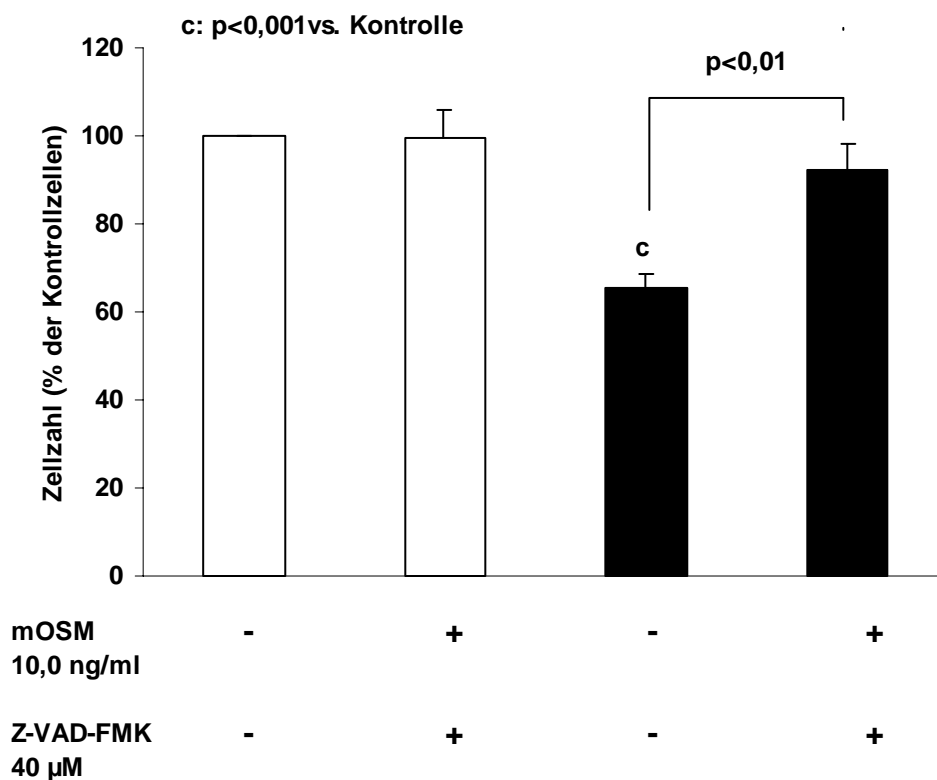


Abb. 22: Aufhebung des negativen Effekts von mOSM auf die Anzahl vitaler Y-1 Zellen durch den allgemeinen Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK

Nach 24stündiger Inkubation mit mOSM (10,0ng/ml) kam es zu einem signifikanten Abfall vitaler Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe. 30minütige Vorinkubation mit dem

allgemeinen Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK (42µM) vor Stimulation mit mOSM (10,0ng/ml) konnte den negativen Effekt beinahe komplett unterdrücken.

3.2.6. Nachweis von Apoptose-Markern in adrenocorticalen Y-1 Zellen nach Stimulation mit mOSM

Über die Detektion proteolytisch gespaltener (cleaved) und somit aktivierter Caspase-3, sowie dem inaktivierten Zielprotein der Caspasen Poly-Adenyl-Ribosyl-Phosphatase (PARP) konnte die Induktion von Apoptose in murinen Y-1 Zellen durch mOSM belegt werden.

3.2.6.1. Nachweis aktivierter Caspase-3

Y-1 Zellen wurden mit mOSM (10,0ng/ml) stimuliert und die proteolytische Spaltung von Caspase-3 im Westernblot-Verfahren untersucht. Nach 24stündiger Inkubation mit mOSM (10,0ng/ml) gelang die Detektion der durch proteolytischen Spaltung aktivierten Caspase-3 (17kD). In unstimulierten Y-1 Zellen (-) konnte keine aktive Caspase-3 nachgewiesen werden. Nach 3, bzw. 6stündiger Inkubationsdauer kam es weder in den unstimulierten, noch in den stimulierten Zellen zu einer Aktivierung der Caspase-3 (Abb.23).

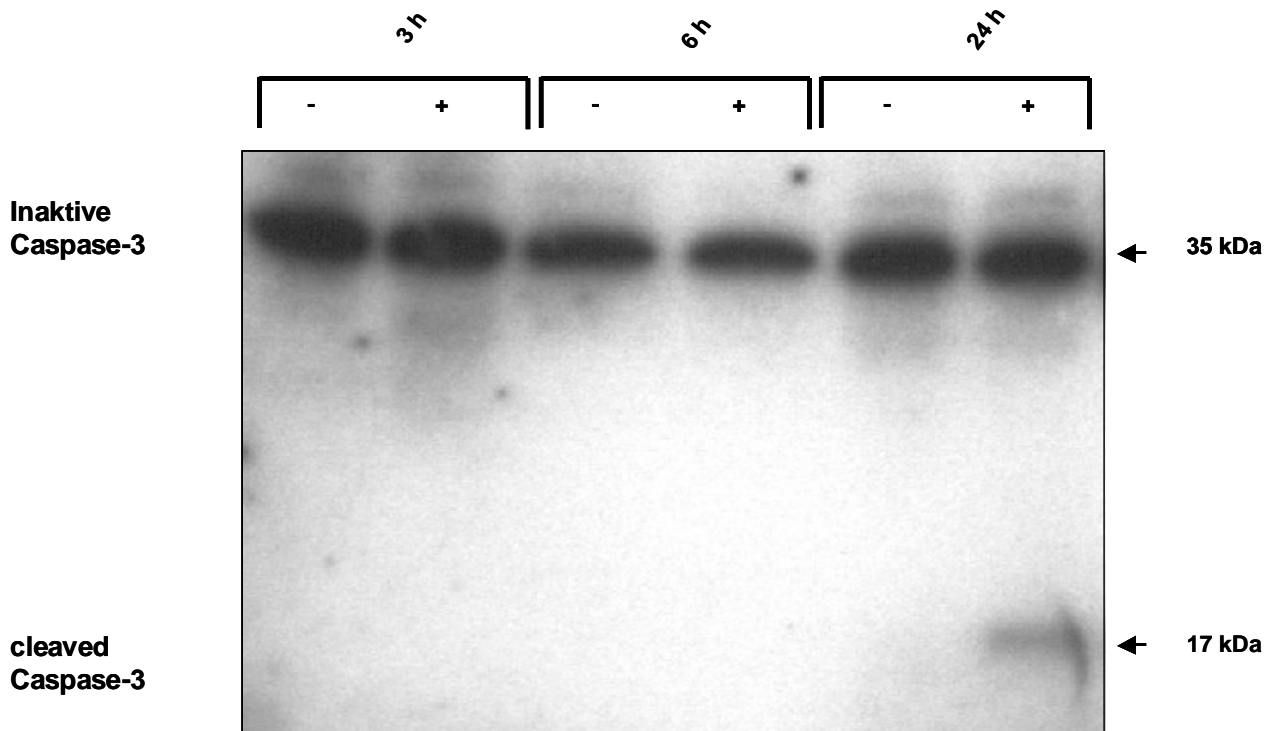


Abb. 23: Westernblot-Nachweis aktivierter Caspase-3 in Y-1 Zellen nach Stimulation mit mOSM

Detektion der aktivierten Caspase-3 (17kD) nach 24stündiger Inkubation mit mOSM (10,0ng/ml), nicht jedoch in unstimulierten Y-1 Zellen (-). Nach 3, bzw. 6stündiger Inkubationsdauer konnte weder in den unstimulierten, noch in den stimulierten Zellen eine Aktivierung der Caspase-3 nachgewiesen werden.

3.2.6.2. Nachweis inaktivierter PARP

Y-1 Zellen wurden mit mOSM (10,0ng/ml) stimuliert und die Deaktivierung von PARP durch die enzymatische Aktivität der Caspasen in Westernblot-Studien untersucht. Während PARP (113 kDa) in unstimulierten wie in stimulierten Zellen zu allen Zeitpunkten nachweisbar war, gelang die Detektion der proteolytischen Spaltung von PARP in ein 89kDa und ein 24kDa Fragment durch Darstellung der 89kDa Bande allein in den stimulierten Zellen nach 24 Stunden (Abb.24).

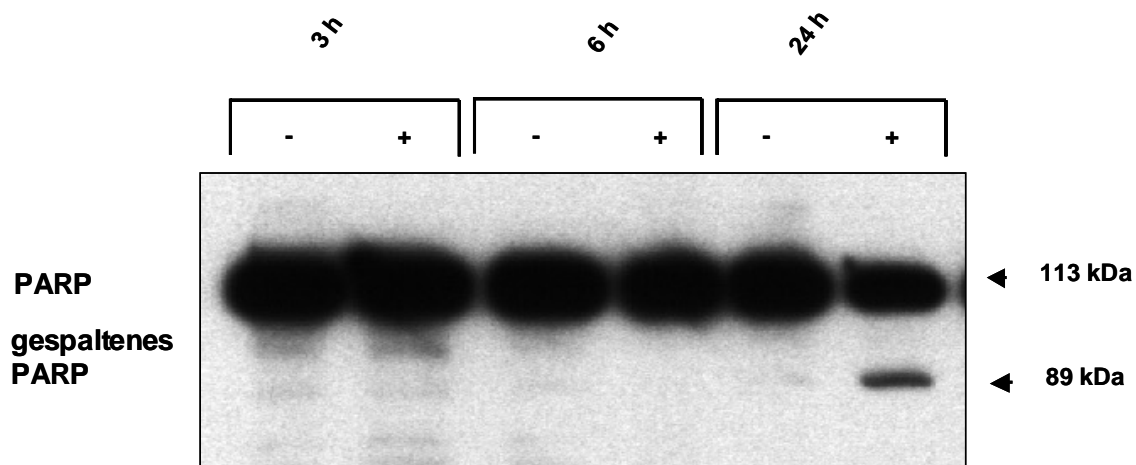


Abb. 24: Westernblot-Nachweis deaktiverter PARP in Y-1 Zellen nach Stimulation mit mOSM

Nach 24stündiger Inkubation mit mOSM (10,0ng/ml) konnte die Deaktivierung von PARP durch proteolytische Spaltung in ein 89kDa und in ein 24kDa Fragment durch Detektion des 89kDa Fragments nachgewiesen werden. In unstimulierten Y-1 Zellen (-) konnte keine PARP-Deaktivierung belegt werden. Nach 3-, bzw. 6stündiger Inkubationsdauer kam es weder in den unstimulierten, noch in den stimulierten Zellen zur proteolytischen Spaltung von PARP.

4. Diskussion

4.1. Unterschiedliche Effekte von murinem und humanem Oncostatin M an der corticotropen Zelle

Um eine adäquate Antwort der corticotropen Zelle auf verschiedene Stressfaktoren sicherstellen zu können, müssen neuroendokrines und neuroimmunes System in engem Kontakt miteinander stehen. Neben dem klassischen endokrinen Weg der CRH-ACTH-Cortisol Achse spielen die Sekretion von Zytokinen durch immunkompetente Zellen und deren Transport zum Zielgewebe über den Blutweg, sowie autokrine und parakrine Zytokinvermittlung eine entscheidende Rolle für die Aktivität der Hypophysen-Nebennierenrindenachse.

Einige gp130-Zytokine sind als Regulatoren der HPA-Achse auf hypothalamischer, hypophysärer und adrenocorticaler Ebene bereits eingehend beschrieben worden (5;12;29;30). Am besten untersucht ist die stimulierende Wirkung von LIF an der corticotropen Zelle (3-5;7;12;13). Für IL-6 konnte eine Stimulation der STAT-abhängigen POMC-Expression (60) und ACTH-Sekretion (42;66) an der murinen Zelllinie AtT-20, sowie an humanen Hypophysen-Adenomen (84) nachgewiesen werden. Ebenso führt Interleukin-1 an AtT-20 Zellen zur STAT-abhängigen POMC-Genexpression und ACTH-Sekretion (11). Neue Studien postulieren auch für NNT-1/BSF-3 und CNTF einen ACTH-stimulierenden Effekt an hypophysären Zellen (10).

Eine Stimulation der ACTH-Sekretion durch die murine AtT-20 Zelllinie (4), sowie durch Hypophysenzellen von Menschen (94) und Ratten (61) nach Stimulation mit humanem Oncostatin M wurde bereits beschrieben.

Untersuchungen zur Wirkung von murinem OSM über den gp130/OSMR Rezeptorkomplex an hypophysären Gewebe lagen hingegen bislang nicht vor. Humanes Oncostatin M bindet in humanem Gewebe sowohl an den gp130/LIFR-Komplex, als auch an den gp130/OSMR-Komplex (67;74;101). Am humanen Zellmodell untersuchte biologischen Aktivitäten von hOSM können also entweder über den gp130/OSMR-Komplex, den gp130/LIFR-Komplex, oder auch über beide Rezeptorkomplexe vermittelt sein. Welchen Signalweg hOSM letztlich aktiviert, hängt wahrscheinlich von der zelltypspezifischen Expression der einzelnen Rezeptoruntereinheiten gp130, LIFR und OSMR ab (67;101;107).

Die Bindung von Oncostatin M in murinem Gewebe an den gp130/OSMR-Komplex unterliegt einer strikten Speziespezifität. Somit bindet murines OSM hier exklusiv an den gp130/OSMR-Komplex (107). Die Signaltransduktion von humanem OSM im murinen Zellmodell erfolgt ausschließlich über den gp130/LIFR-Komplex (67).

Die vorliegenden Studien vergleichen erstmals die Wirkungen von humanem und murinem Oncostatin M an der corticotrophen Zelllinie AtT-20 und zeigen, dass die beiden Zytokine zu unterschiedlichen Effekten am murinen Zellmodell führen. Dies lässt eine differenzierte Aussage über die Rolle des gp130/LIFR-Komplex und des gp130/OSMR-Komplex an der corticotrophen Funktion zu. Alle bisherigen Studien, die eine OSM-induzierte Stimulation der ACTH-Sekretion durch adenohipophysäres Gewebe beschreiben, wurden vor der Klonierung des murinen OSM 1996 (112), und somit mit humanen OSM durchgeführt (2;61;85;94). Dadurch können diese Untersuchungen zwar die gp130/LIFR-Komplex vermittelte corticotrophe Wirkung von humanen OSM beschreiben, erlauben aber keinerlei Aussage über eine Beteiligung des gp130/OSMR-Komplexes an der Modulation der HPA-Achse auf hypophysärer Ebene. Die hier vorgestellten Ergebnisse stellen erstmals die Effekte von hOSM (als Ligand des gp130/LIFR-Komplexes im murinen Zellmodell) den von mOSM (mit ausschließlicher Bindung an den gp130/OSMR-Komplex) gegenüber.

Inkubation corticotropher AtT-20 Zellen mit humanem OSM und murinem LIF führte zur Aktivierung der Jak-STAT-Kaskade, nachgewiesen durch eine signifikant erhöhte Phosphorylierung von STAT-1 und STAT-3 auf vergleichbare Level. Humanes OSM und murines LIF führten an AtT-20 Zellen zur STAT-abhängigen Genexpression von POMC und SOCS-3. Ferner stimulierten hOSM und mLIF die ACTH-Sekretion durch murine AtT-20 Zellen.

Die bereits vorbeschriebene STAT-abhängige Stimulation der POMC-Genexpression und ACTH-Sekretion durch AtT-20 Zellen über den gp130/LIFR-Komplex (1;85;94) konnte somit bestätigt werden.

Murines Oncostatin M zeigte in den Versuchen hingegen keinerlei Wirkung an der corticotrophen Zelllinie AtT-20. Eine Aktivierung der Jak-STAT-Kaskade konnte durch mOSM nicht nachgewiesen werden. Es kam durch murines OSM zu keinem Anstieg der Genexpression von POMC und mSOCS3, die ACTH-Sekretion nach Stimulation mit murinem OSM unterschied sich nicht signifikant von der unstimulierten Vergleichsgruppe.

Der Nachweis signifikanter biologischer Effekte durch rekombinantes murines OSM der selben Charge an der Zelllinie Y-1 konnte eine Inaktivität des in den Versuchsreihen verwendeten Zytokins ausschließen.

RT-PCR Studien ermöglichten den Nachweis der Rezeptoruntereinheiten gp130 und LIFR in AtT-20 Zellen und in murinem hypophysären Primärgewebe. Passend zu diesen Ergebnissen wurde an anderer Stelle der Nachweis der Rezeptoruntereinheiten gp130 und LIFR in AtT-20 Zellen durch Immunneutralisation (85) beschrieben, zur Expression von gp130 in AtT-20 Zellen liegen zusätzlich Westernblot-Studien vor (8).

Die Detektion von OSMR mittels PCR gelang lediglich in murinem Hypophysengewebe, nicht jedoch in der corticotrophen Zelllinie AtT-20.

Während die Expression der LIFR-Untereinheit in post-mortem Studien in 6 von 6 humanen Hypophysen und in 6 von 6 corticotrophen Adenomen nachgewiesen werden konnte (47),

fand sich die OSMR-Untereinheit hingegen lediglich in 1 von 6 humanen Hypophysen und in keinem der 6 corticotrophen Adenomen (47).

Zusammengefasst bewirkt hOSM an der corticotrophen Zelllinie AtT-20 über den gp130/LIFR-Komplex die Aktivierung der Jak-STAT-Kaskade, führt zur STAT-abhängigen Genexpression von POMC und SOCS-3 und schließlich zur ACTH-Sekretion. Hingegen konnte eine Aktivierung der Jak-STAT-Kaskade mit folgender STAT-abhängiger Genexpression von POMC und SOCS-3 und ACTH-Sekretion durch mOSM über den gp130/OSMR-Komplex nicht nachgewiesen werden. Oncostatin M ist also über den gp130/LIFR-Komplex an der Regulierung der corticotrophen Funktion beteiligt, der gp130/OSMR-Komplex spielt auf hypophysärer Ebene jedoch vermutlich keine Rolle bei der neuroimmunoendokrinen Modulation der HPA-Achse bei Maus und Mensch.

4.2. Effekte von Oncostatin M an der adrenocorticalen Zelle

Auf adrenocorticaler Ebene sind Zytokine als direkte Modulatoren der Stressantwort der Hypothalamus–Hypophysen-Nebennierenrinden–Achse bekannt. Eine IL–6 vermittelte Corticosteronausschüttung konnte an bovinen und humanen adrenocorticalen Zellen gezeigt werden (73;108). Auch IL-11 (15) und LIF (12) sind als direkte Modulatoren der adrenocorticalen Funktion beschrieben worden.

Die hier präsentierten in vitro-Ergebnisse zeigen erstmals eine Stimulation der Steroidsekretion muriner Y-1 Zellen durch Oncostatin M.

Wie bereits beschrieben erfolgt die Signaltransduktion von mOSM in murinem Gewebe speziesspezifisch über den gp130/OSMR-Komplex, hOSM bindet in murinem Gewebe ausschließlich an den gp130/LIFR–Komplex.

RT–PCR-Studien konnten die Expression der Rezeptoruntereinheiten gp130, LIFR und OSMR in RNA von primären murinen Nebennierengewebe und von murinen Y–1 Zellen nachweisen. Damit stehen in diesen Geweben alle benötigten Rezeptoruntereinheiten zur Signaltransduktion von mLIF (gp130/LIFR), mOSM (gp130/OSMR) und hOSM (gp130/LIFR) zur Verfügung.

Rezeptorbindung von mLIF, hOSM und mOSM aktivierte den intrazellulären Signalweg der Jak–STAT–Kaskade, was durch eine signifikante Phosphorylierung von STAT-1 und STAT-3 durch mLIF, mOSM und hOSM nachgewiesen werden konnte. Murines Oncostatin M führte, anders als humanes Oncostatin M und murines LIF, darüber hinaus zur Phosphorylierung von STAT-5. Murines und humanes OSM führten wie mLIF zur STAT-abhängigen SOCS-3 Genexpression in murinen Y-1 Zellen. Alle drei untersuchten Zytokine stimulierten im Radioimmunassay die Steroidsekretion von Y–1 Zellen, wobei die Stimulation durch mOSM signifikant höher lag als durch hOSM und mLIF. Die Stimulation der Steroidsekretion durch mOSM erwies sich als zeit- und dosisabhängig.

Anders als am murinen corticotrophen Zellmodell konnten an der murinen adrenocorticalen Zelllinie Y-1 Effekte sowohl durch murines OSM über den gp130/OSMR-Komplex, als auch durch humanes OSM und mLIF über den gp130/LIFR-Komplex nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse charakterisieren OSM erstmals als wichtigen neuroimmunoendokrinen Modulator der adrenocorticalen Zellfunktion.

OSM und LIF teilen eine Reihe biologischer Aktivitäten, so zum Beispiel die Vermittlung der Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen durch Hepatozyten (86) und die Hemmung der Differenzierung von embryonalen Stammzellen in vitro (88). Daneben übt OSM eine Reihe zytokinspezifischer biologischer Aktivitäten aus. So spielt Oncostatin M eine Rolle bei Prozessen des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung verschiedener Zellarten, wobei sowohl positive als auch negative Effekte beschrieben sind. Oncostatin M, nicht jedoch LIF wirkt proliferationshemmend auf die humane Melanomzelllinie A375 (25;72;113). Auch auf die Proliferation von normalem und tumorös verändertem Brustgewebe wirkt OSM in vitro hemmend, LIF hingegen zeigte an Mammakarzinomzellen genau den gegenteiligen, nämlich wachstumsfördernden Effekt, jedoch keine Wirkung an gesunden Brustdrüsengewebe (58;65;70). Eine negative Wirkung auf das Wachstumsverhalten übt OSM auch zyklusspezifisch in der Sekretionsphase auf humanes endometriales Gewebe aus (82).

Andererseits ist OSM als fibroproliferativer Faktor an der Wundheilung beteiligt (14), und wirkt proliferationsfördernd an HIV-assoziierten Karposi-Sarkomzellen (27;75) und an Plasmazytomzellen (14;16;17;26). Oncostatin M induziert in Neuronen HIV-infizierter Patienten Apoptose (37), wirkt auf der anderen Seite aber anti-apoptotisch an humanen Osteoblasten und pulmonalen Fibroblasten (20;90).

Eine mögliche Antwort auf die konträren Effekte von OSM auf Zellwachstum und Apoptose-Induktion könnte zumindest teilweise durch unterschiedliche Expression und Aktivierung der

Rezeptorkomplexe gp130/LIFR und gp130/OSMR in unterschiedlichen Gewebetypen liegen und wird weiter zu untersuchen sein.

In den hier vorgestellten Untersuchungen konnte erstmals die Induktion von Apoptose durch mOSM an der adrenocorticalen Tumorzelllinie Y-1 gezeigt werden.

Die Inkubation mit mOSM führte zur Entdifferenzierung und Ablösung der murinen Y-1 Zellen. Dieser Effekt war sowohl zytokinspezifisch (andere gp130 Zytokine wie mLIF und hOSM zeigten keinen derartigen Effekt), als auch zellspezifisch (an den Zelllinien AtT-20 und HepG2 konnten keine Veränderungen der Zellmorphologie oder des Wachstumsverhalten nach Stimulation mit mOSM beobachtet werden).

Zur Objektivierung der zellmorphologische Beobachtungen wurden Proliferationsassays durchgeführt. Dadurch konnte eine signifikante, dosisabhängige Abnahme der Anzahl vitaler Zellen nach Stimulation mit mOSM nachgewiesen werden, während hOSM und mLIF keinen signifikanten Effekt auf die Zahl vitaler Y-1 Zellen zeigten. Durch Vorinkubation mit dem generellen Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK konnte der negative Effekt von mOSM auf die Anzahl vitaler Y-1 Zellen signifikant antagonisiert werden. Durch Inhibierung der Caspasen wird ein zentraler Schritt der Apoptose, nämlich die enzymatische proteolytische Spaltung zellulärer Bestandteile blockiert. Da die Kaskade der Caspasen beim toxisch induzierten Zelluntergang nicht aktiviert wird weist das Überleben der Zellen unter Inhibierung dieses Proteasensystems auf ein spezifisches apoptotisches Absterben der Zellen hin.

Westernblot-Studien konnten die Aktivierung von Caspase-3 durch proteolytische Spaltung nach Stimulation mit mOSM nachweisen. Die Aktivierung der Caspasen mit folgender irreversibler Spaltung zellulärer Proteine stellt einen essentiellen Schritt apoptotischen Zelluntergangs dar und findet nur im Rahmen der Apoptose statt.

Die Inaktivierung der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) als Zielprotein der proteolytischen Spaltung durch Caspasen konnte mittels Western-Blot in mOSM-stimulierten Y-1 Zellen gezeigt werden. Auch wenn die Aktivierung und Inaktivierung von PARP nicht

unerlässlich für apoptotischen Zelluntergang ist, ist bekannt, dass PARP im frühen Apoptose-Stadium aktiviert, und zum Ende des Prozesses durch Apoptose-spezifische Proteasen, namentlich durch die Caspasen-3 und -7 inaktiviert wird (Abb.25) (33).

Da durch Vorinkubation mit dem Jak-2 Inhibitor die Abnahme vitaler Zellen durch mOSM ebenfalls signifikant antagonisiert werden konnte, scheint der beschriebene Effekt abhängig von der Jak-STAT-Kaskade zu sein. STAT-3 abhängige wachstumssupprimierende Effekte von OSM sind für mehrere Zellmodelle beschrieben, so z.B. für menschliche Karposi-Sarkom Zellen (71), murine Brustdrüsenzellen (58) und Mammacarcinomzellen (114).

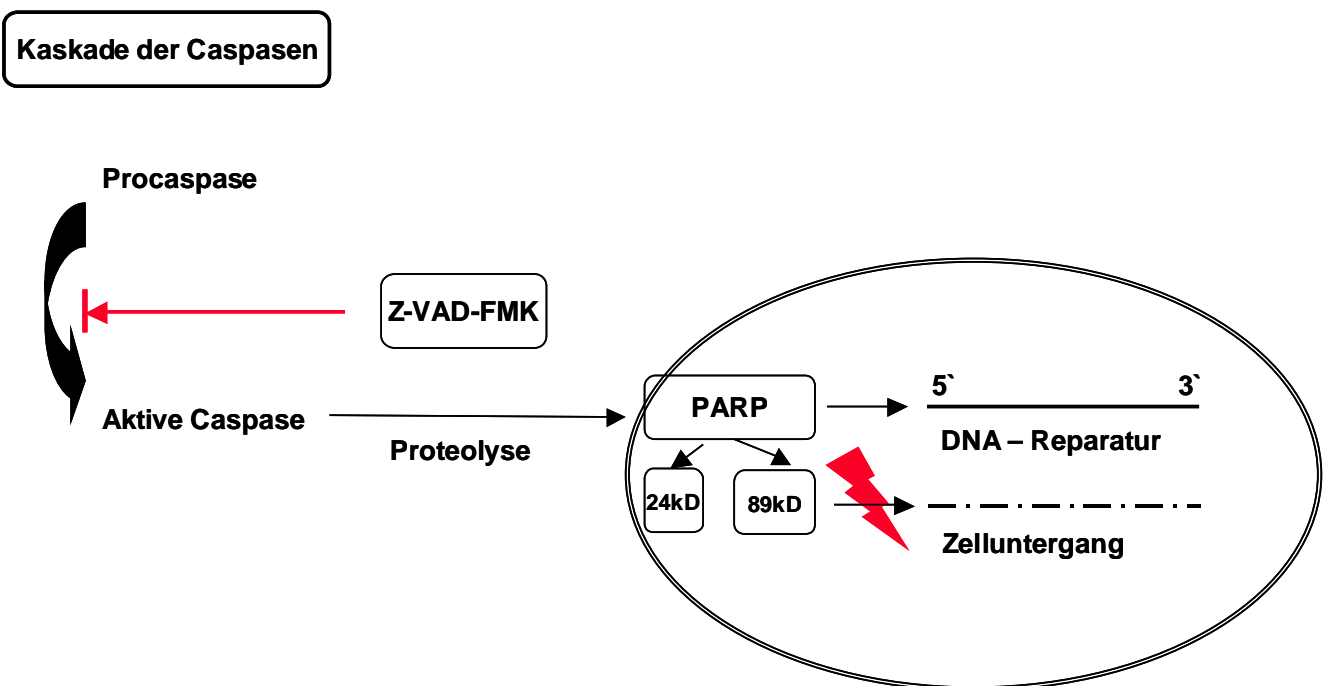


Abb. 25: Induktion von Apoptose in adrenocortikalen Tumorzellen durch mOSM

Durch Aktivierung von Caspasen kommt es zur irreversiblen proteolytischen Spaltung intrazellulärer Proteine, darunter PARP, ein Enzym, das an Reparaturmechanismen auf DNA-Ebene beteiligt ist. Fehlen diese Reparaturvorgänge, so kommt es zum Untergang der Zelle.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzlich zur spezifischen Induktion von Apoptose andere Faktoren wie Wachstumsinhibition und Unterbrechung des Zellzyklus eine Rolle für die beschriebenen Effekte von OSM auf Y-1 Zellen spielen. Die im Western-Blot nachgewiesene proteolytische Spaltung von Caspase-3 und PARP sprechen jedoch ebenso wie die Unterbindung des mOSM vermittelten Zellsterbens durch den generellen Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK für die Induktion von Apoptose durch mOSM in adrenocorticalen Y-1 Tumorzellen.

Da mOSM im murinen Zellmodell ausschließlich an den gp130/OSMR-Komplex bindet, erfolgt der an murinen adrenocorticalen Tumorzellen gezeigte proapoptotische Effekt von OSM spezifisch über den gp130/OSMR-Komplex.

In weiteren Studien, etwa mit OSMR-knock-out Mäusen (102) in murinen in vivo Studien muss die Induktion von Apoptose durch den gp130/OSMR-Liganden mOSM weiter geklärt werden. Für humanes OSM muss in weiteren Studien spezifiziert werden, ob die an einzelnen Zelltypen beschriebenen proliferativen/antiproliferativen Effekte über den gp130/LIFR- oder über den gp130/OSMR-Komplex vermittelt werden (9).

Ein möglicher Einsatz eines gp130/OSMR-Liganden als immuntherapeutisches Agens in der Therapie von adrenocorticalen Tumoren bleibt zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Die vorgestellten Ergebnisse konnten Oncostatin M als Modulator der Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse charakterisieren. Es konnte gezeigt werden, dass Oncostatin M an hypophysärem Gewebe über den gp130/LIFR-Komplex zur Aktivierung der Jak-STAT-Kaskade, STAT-abhängigen POMC-Genexpression und zur ACTH-Sekretion führt.

Im Gegensatz dazu exprimiert die corticotrope Zelle keine OSMR-Untereinheit, so dass Oncostatin M die corticotrope Funktion ausschließlich über den gp130/LIFR-Komplex, jedoch nicht über den gp130/OSMR-Komplex moduliert.

Auf adrenocorticaler Zellebene konnte dagegen erstmals gezeigt werden, dass Oncostatin M auch über den gp130/OSMR-Komplex ein potenter Modulator der adrenocorticalen Zellfunktion ist.

Weiterhin wurde erstmals die Induktion von Apoptose durch murines OSM an murinen adrenocorticalen Tumorzellen beschrieben. Es bleibt zu zeigen, dass der an der murinen Zelllinie Y-1 nachgewiesene Effekt auch auf humane Tumorzellen übertragbar ist.

Ein zellspezifischer apoptotischer Effekt von OSM auf adrenocorticale Tumorzellen könnte ein potentieller wertvoller Mechanismus zur Entwicklung einer spezifischen Therapie des hochmalignen Nebennierenrindenkarzinoms darstellen.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Akita S, Webster J, Ren SG, Takino H, Said J, Zand O et al. Human and murine pituitary expression of leukemia inhibitory factor. Novel intrapituitary regulation of adrenocorticotropin hormone synthesis and secretion. *J Clin Invest* 1995; 95(3):1288-1298.
- (2) Akita S, Webster J, Ren SG, Takino H, Said J, Zand O et al. Human and murine pituitary expression of leukemia inhibitory factor. Novel intrapituitary regulation of adrenocorticotropin hormone synthesis and secretion. *J Clin Invest* 1995; 95(3):1288-1298.
- (3) Akita S, Webster J, Ren SG, Takino H, Said J, Zand O et al. Human and murine pituitary expression of leukemia inhibitory factor. Novel intrapituitary regulation of adrenocorticotropin hormone synthesis and secretion. *J Clin Invest* 1995; 95(3):1288-1298.
- (4) Akita S, Webster J, Ren SG, Takino H, Said J, Zand O et al. Human and murine pituitary expression of leukemia inhibitory factor. Novel intrapituitary regulation of adrenocorticotropin hormone synthesis and secretion. *J Clin Invest* 1995; 95(3):1288-1298.
- (5) Arzt E. gp130 cytokine signaling in the pituitary gland: a paradigm for cytokine-neuro-endocrine pathways. *J Clin Invest* 2001; 108(12):1729-1733.
- (6) Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(2):255-260.
- (7) Auernhammer CJ, Bousquet C, Chesnokova V, Melmed S. SOCS proteins: modulators of neuroimmunoendocrine functions. Impact on corticotroph LIF signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:658-664.
- (8) Auernhammer CJ, Chesnokova V, Bousquet C, Melmed S. Pituitary corticotroph SOCS-3: novel intracellular regulation of leukemia-inhibitory factor-mediated proopiomelanocortin gene expression and adrenocorticotropin secretion. *Mol Endocrinol* 1998; 12(7):954-961.
- (9) Auernhammer CJ, Dorn F, Vlotides G, Hengge S, Kopp FB, Spoetl G et al. The oncostatin M receptor/gp130 ligand murine oncostatin M induces apoptosis in adrenocortical Y-1 tumor cells. *J Endocrinol* 2004; 180(3):479-486.
- (10) Auernhammer CJ, Isele NB, Kopp FB, Spoetl G, Cengic N, Weber MM et al. 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* 2003; 144(4):1202-1210.
- (11) Auernhammer CJ, Melmed S. 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* 1999; 140(4):1559-1566.

- (12) Auernhammer CJ, Melmed S. Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function. *Endocr Rev* 2000; 21(3):313-345.
- (13) Auernhammer CJ, Melmed S. The central role of SOCS-3 in integrating the neuro-immunoendocrine interface. *J Clin Invest* 2001; 108(12):1735-1740.
- (14) Bamber B, Reife RA, Haugen HS, Clegg CH. Oncostatin M stimulates excessive extracellular matrix accumulation in a transgenic mouse model of connective tissue disease. *J Mol Med* 1998; 76(1):61-69.
- (15) Bamberger AM, Schulte HM, Wullbrand A, Jung R, Beil FU, Bamberger CM. Expression of leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor (LIF-R) in the human adrenal cortex: implications for steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 162(1-2):145-149.
- (16) Barton BE, Jackson JV, Lee F, Wagner J. Oncostatin M stimulates proliferation in B9 hybridoma cells: potential role of oncostatin M in plasmacytoma development. *Cytokine* 1994; 6(2):147-153.
- (17) Barton BE, Murphy TF. Constitutive expression of IL-6-LIKE cytokines in normal bone marrow: implications for pathophysiology of myeloma. *Cytokine* 2000; 12(10):1537-1545.
- (18) Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(18):6934-6938.
- (19) Becker S, Groner B, Muller CW. Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature* 1998; 394(6689):145-151.
- (20) Bellido T, O'Brien CA, Roberson PK, Manolagas SC. Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1998; 273(33):21137-21144.
- (21) Bjorbak C, Lavery HJ, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS et al. SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J Biol Chem* 2000; 275(51):40649-40657.
- (22) Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE, Garcia KC. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 2003; 300(5628):2101-2104.
- (23) Boulton TG, Stahl N, Yancopoulos GD. Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors. *J Biol Chem* 1994; 269(15):11648-11655.
- (24) Bousquet C, Susini C, Melmed S. Inhibitory roles for SHP-1 and SOCS-3 following pituitary proopiomelanocortin induction by leukemia inhibitory factor. *J Clin Invest* 1999; 104(9):1277-1285.

- (25) Brown TJ, Lioubin MN, Marquardt H. Purification and characterization of cytostatic lymphokines produced by activated human T lymphocytes. Synergistic antiproliferative activity of transforming growth factor beta 1, interferon-gamma, and oncostatin M for human melanoma cells. *J Immunol* 1987; 139(9):2977-2983.
- (26) Burger R, Guenther A, Bakker F, Schmalzing M, Bernand S, Baum W et al. Gp130 and ras mediated signaling in human plasma cell line INA-6: a cytokine-regulated tumor model for plasmacytoma. *Hematol J* 2001; 2(1):42-53.
- (27) Cai J, Gill PS, Masood R, Chandrasoma P, Jung B, Law RE et al. Oncostatin-M is an autocrine growth factor in Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol* 1994; 145(1):74-79.
- (28) Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE, Jr., Kuriyan J. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 1998; 93(5):827-839.
- (29) Chesnokova V, Auernhammer CJ, Melmed S. Murine leukemia inhibitory factor gene disruption attenuates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis stress response. *Endocrinology* 1998; 139(5):2209-2216.
- (30) Chesnokova V, Melmed S. Minireview: Neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules. *Endocrinology* 2002; 143(5):1571-1574.
- (31) Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P et al. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 1997; 278(5344):1803-1805.
- (32) Darnell JE, Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997; 277(5332):1630-1635.
- (33) Decker P, Isenberg D, Muller S. Inhibition of caspase-3-mediated poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) apoptotic cleavage by human PARP autoantibodies and effect on cells undergoing apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275(12):9043-9046.
- (34) Derouet D, Rousseau F, Alfonsi F, Froger J, Hermann J, Barbier F et al. Neuropeptin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(14):4827-4832.
- (35) Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem* 2000; 275(21):15985-15991.
- (36) Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 1997; 387(6636):921-924.
- (37) Ensoli F, Fiorelli V, DeCristofaro M, Santini MD, Novi A, Vannelli B et al. Inflammatory cytokines and HIV-1-associated neurodegeneration: oncostatin-M produced by mononuclear cells from HIV-1-infected individuals induces apoptosis of primary neurons. *J Immunol* 1999; 162(10):6268-6277.
- (38) Ernst M, Novak U, Nicholson SE, Layton JE, Dunn AR. The carboxyl-terminal domains of gp130-related cytokine receptors are necessary for suppressing

- embryonic stem cell differentiation. Involvement of STAT3. *J Biol Chem* 1999; 274(14):9729-9737.
- (39) Eyckerman S, Broekaert D, Verhee A, Vandekerckhove J, Tavernier J. Identification of the Y985 and Y1077 motifs as SOCS3 recruitment sites in the murine leptin receptor. *FEBS Lett* 2000; 486(1):33-37.
- (40) Fujitani Y, Hibi M, Fukada T, Takahashi-Tezuka M, Yoshida H, Yamaguchi T et al. An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene* 1997; 14(7):751-761.
- (41) Fukada T, Hibi M, Yamanaka Y, Takahashi-Tezuka M, Fujitani Y, Yamaguchi T et al. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 1996; 5(5):449-460.
- (42) Fukata J, Usui T, Naitoh Y, Nakai Y, Imura H. Effects of recombinant human interleukin-1 alpha, -1 beta, 2 and 6 on ACTH synthesis and release in the mouse pituitary tumour cell line AtT-20. *J Endocrinol* 1989; 122(1):33-39.
- (43) Giovannini M, Djabali M, McElligott D, Selleri L, Evans GA. Tandem linkage of genes coding for leukemia inhibitory factor (LIF) and oncostatin M (OSM) on human chromosome 22. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 64(3-4):240-244.
- (44) Giovannini M, Selleri L, Hermanson GG, Evans GA. Localization of the human oncostatin M gene (OSM) to chromosome 22q12, distal to the Ewing's sarcoma breakpoint. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 62(1):32-34.
- (45) Gomez-Lechon MJ. Oncostatin M: signal transduction and biological activity. *Life Sci* 1999; 65(20):2019-2030.
- (46) Greenlund AC, Farrar MA, Viviano BL, Schreiber RD. Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J* 1994; 13(7):1591-1600.
- (47) Hanisch A, Dieterich KD, Dietzmann K, Ludecke K, Buchfelder M, Fahlbusch R et al. Expression of members of the interleukin-6 family of cytokines and their receptors in human pituitary and pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(11):4411-4414.
- (48) Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of IL-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; Pt.
- (49) Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998; 334 (Pt 2):297-314.
- (50) Heinrich PC, Bode JG, Graeve L, Haan C, Martens A, Muller-Newen G et al. Modulation and termination of interleukin-6 signalling. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11(3):512-513.
- (51) Hermanns HM, Radtke S, Schaper F, Heinrich PC, Behrmann I. Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines. The adapter protein Shc is

- specifically recruited to the oncostatin M receptor. *J Biol Chem* 2000; 275(52):40742-40748.
- (52) Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 1990; 63(6):1149-1157.
- (53) Hibi M, Nakajima K, Hirano T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med* 1996; 74(1):1-12.
- (54) Hoffman RC, Moy FJ, Price V, Richardson J, Kaubisch D, Frieden EA et al. Resonance assignments for Oncostatin M, a 24-kDa alpha-helical protein. *J Biomol NMR* 1996; 7(4):273-282.
- (55) Hortner M, Nielsch U, Mayr LM, Heinrich PC, Haan S. A new high affinity binding site for suppressor of cytokine signaling-3 on the erythropoietin receptor. *Eur J Biochem* 2002; 269(10):2516-2526.
- (56) Hortner M, Nielsch U, Mayr LM, Johnston JA, Heinrich PC, Haan S. Suppressor of cytokine signaling-3 is recruited to the activated granulocyte-colony stimulating factor receptor and modulates its signal transduction. *J Immunol* 2002; 169(3):1219-1227.
- (57) Horvath CM. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci* 2000; 25(10):496-502.
- (58) Hutt JA, DeWille JW. Oncostatin M induces growth arrest of mammary epithelium via a CCAAT/enhancer-binding protein delta-dependent pathway. *Mol Cancer Ther* 2002; 1(8):601-610.
- (59) Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G et al. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 2001; 409(6818):349-354.
- (60) Katahira M, Iwasaki Y, Aoki Y, Oiso Y, Saito H. Cytokine regulation of the rat proopiomelanocortin gene expression in AtT-20 cells. *Endocrinology* 1998; 139(5):2414-2422.
- (61) Kim DS, Choi HS, Park YS, Kim TW. Effects of oncostatin M on hormone release of rat pituitary cells in primary culture. *J Korean Med Sci* 2000; 15(3):323-326.
- (62) Lai CF, Ripperger J, Morella KK, Wang Y, Gearing DP, Fey GH et al. Separate signaling mechanisms are involved in the control of STAT protein activation and gene regulation via the interleukin 6 response element by the box 3 motif of gp130. *J Biol Chem* 1995; 270(25):14847-14850.
- (63) Lechleider RJ, Sugimoto S, Bennett AM, Kashishian AS, Cooper JA, Shoelson SE et al. Activation of the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SH-PTP2 by its binding site, phosphotyrosine 1009, on the human platelet-derived growth factor receptor. *J Biol Chem* 1993; 268(29):21478-21481.
- (64) Lehmann U, Schmitz J, Weissenbach M, Sobota RM, Hortner M, Friederichs K et al. SHP2 and SOCS3 contribute to Y759-dependent attenuation of IL-6-signaling through gp130. *J Biol Chem* 2002.

- (65) Li C, Ahlborn TE, Kraemer FB, Liu J. Oncostatin M-induced growth inhibition and morphological changes of MDA-MB231 breast cancer cells are abolished by blocking the MEK/ERK signaling pathway. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 66(2):111-121.
- (66) Li QL, Jansen E, Friedman TC. Regulation of prohormone convertase 1 (PC1) by gp130-related cytokines. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 158(1-2):143-152.
- (67) Lindberg RA, Juan TS, Welcher AA, Sun Y, Cupples R, Guthrie B et al. Cloning and characterization of a specific receptor for mouse oncostatin M. *Mol Cell Biol* 1998; 18(6):3357-3367.
- (68) Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD et al. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(18):10626-10631.
- (69) Liu B, Shuai K. Induction of apoptosis by protein inhibitor of activated Stat1 through c-Jun NH2-terminal kinase activation. *J Biol Chem* 2001; 276(39):36624-36631.
- (70) Liu J, Hadjokas N, Mosley B, Estrov Z, Spence MJ, Vestal RE. Oncostatin M-specific receptor expression and function in regulating cell proliferation of normal and malignant mammary epithelial cells. *Cytokine* 1998; 10(4):295-302.
- (71) Lundquist A, Barre B, Bienvenu F, Hermann J, Avril S, Coqueret O. Kaposi sarcoma-associated viral cyclin K overrides cell growth inhibition mediated by oncostatin M through STAT3 inhibition. *Blood* 2003; 101(10):4070-4077.
- (72) Malik N, Kallestad JC, Gunderson NL, Austin SD, Neubauer MG, Ochs V et al. Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. *Mol Cell Biol* 1989; 9(7):2847-2853.
- (73) Michl P, Beikler T, Engelhardt D, Weber MM. Interleukin-3 and interleukin-6 stimulate bovine adrenal cortisol secretion through different pathways. *J Neuroendocrinol* 2000; 12(1):23-28.
- (74) Mosley B, De Imus C, Friend D, Boiani N, Thoma B, Park LS et al. Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem* 1996; 271(51):32635-32643.
- (75) Murakami-Mori K, Mori S, Bonavida B. Molecular pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's sarcoma: growth and apoptosis. *Adv Cancer Res* 2000; 78:159-197.
- (76) Myers MP, Andersen JN, Cheng A, Tremblay ML, Horvath CM, Parisien JP et al. TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 2001; 276(51):47771-47774.
- (77) Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 1997; 387(6636):924-929.

- (78) Nakashima K, Taga T. gp130 and the IL-6 family of cytokines: signaling mechanisms and thrombopoietic activities. *Semin Hematol* 1998; 35(3):210-221.
- (79) Narazaki M, Fujimoto M, Matsumoto T, Morita Y, Saito H, Kajita T et al. Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(22):13130-13134.
- (80) Nicholson SE, De Souza D, Fabri LJ, Corbin J, Willson TA, Zhang JG et al. Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(12):6493-6498.
- (81) Nicholson SE, Willson TA, Farley A, Starr R, Zhang JG, Baca M et al. 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* 1999; 18(2):375-385.
- (82) Ohata Y, Harada T, Fujii A, Yoshida S, Iwabe T, Terakawa N. Menstrual cycle-specific inhibition of endometrial stromal cell proliferation by oncostatin M. *Mol Hum Reprod* 2001; 7(7):665-670.
- (83) Pennica D, Wood WI, Chien KR. Cardiotrophin-1: a multifunctional cytokine that signals via LIF receptor-gp 130 dependent pathways. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7(1):81-91.
- (84) Pereda MP, Lohrer P, Kovalovsky D, Perez CC, Goldberg V, Losa M et al. Interleukin-6 is inhibited by glucocorticoids and stimulates ACTH secretion and POMC expression in human corticotroph pituitary adenomas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108(3):202-207.
- (85) Ray DW, Ren SG, Melmed S. Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates proopiomelanocortin (POMC) expression in a corticotroph cell line. Role of STAT pathway. *J Clin Invest* 1996; 97(8):1852-1859.
- (86) Richards CD, Brown TJ, Shoyab M, Baumann H, Gauldie J. Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro. *J Immunol* 1992; 148(6):1731-1736.
- (87) Rose TM, Bruce AG. Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(19):8641-8645.
- (88) Rose TM, Weiford DM, Gunderson NL, Bruce AG. Oncostatin M (OSM) inhibits the differentiation of pluripotent embryonic stem cells in vitro. *Cytokine* 1994; 6(1):48-54.
- (89) Sasaki A, Yasukawa H, Shouda T, Kitamura T, Dikic I, Yoshimura A. CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem* 2000; 275(38):29338-29347.
- (90) Scaffidi AK, Mutsaers SE, Moodley YP, McAnulty RJ, Laurent GJ, Thompson PJ et al. Oncostatin M stimulates proliferation, induces collagen production and inhibits apoptosis of human lung fibroblasts. *Br J Pharmacol* 2002; 136(5):793-801.

- (91) Schaper F, Gendo C, Eck M, Schmitz J, Grimm C, Anhuf D et al. Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem J* 1998; 335 (Pt 3):557-565.
- (92) Schiemann WP, Bartoe JL, Nathanson NM. Box 3-independent signaling mechanisms are involved in leukemia inhibitory factor receptor alpha- and gp130-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase. Evidence for participation of multiple signaling pathways which converge at Ras. *J Biol Chem* 1997; 272(26):16631-16636.
- (93) Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem* 2000; 275(17):12848-12856.
- (94) Shimon I, Yan X, Ray DW, Melmed S. Cytokine-dependent gp130 receptor subunit regulates human fetal pituitary adrenocorticotropin hormone and growth hormone secretion. *J Clin Invest* 1997; 100(2):357-363.
- (95) Soldani C, Scovassi AI. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* 2002; 7(4):321-328.
- (96) Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE, Jr., Yancopoulos GD. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 1995; 267(5202):1349-1353.
- (97) Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997; 387(6636):917-921.
- (98) Taga T. The signal transducer gp130 is shared by interleukin-6 family of haematopoietic and neurotrophic cytokines. *Ann Med* 1997; 29(1):63-72.
- (99) Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:797-819.
- (100) Tamm I, Schriever F, Dorken B. Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *Lancet Oncol* 2001; 2(1):33-42.
- (101) Tanaka M, Hara T, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Miyajima A. Reconstitution of the functional mouse oncostatin M (OSM) receptor: molecular cloning of the mouse OSM receptor beta subunit. *Blood* 1999; 93(3):804-815.
- (102) Tanaka M, Hirabayashi Y, Sekiguchi T, Inoue T, Katsuki M, Miyajima A. Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* 2003; 102(9):3154-3162.
- (103) Tanuma N, Nakamura K, Shima H, Kikuchi K. Protein-tyrosine phosphatase PTPepsilon C inhibits Jak-STAT signaling and differentiation induced by interleukin-6 and leukemia inhibitory factor in M1 leukemia cells. *J Biol Chem* 2000; 275(36):28216-28221.
- (104) Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281(5381):1312-1316.

- (105) Verdier F, Chretien S, Muller O, Varlet P, Yoshimura A, Gisselbrecht S et al. Proteasomes regulate erythropoietin receptor and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) activation. Possible involvement of the ubiquitinated Cis protein. *J Biol Chem* 1998; 273(43):28185-28190.
- (106) Verdier F, Rabionet R, Gouilleux F, Beisenherz-Huss C, Varlet P, Muller O et al. A sequence of the CIS gene promoter interacts preferentially with two associated STAT5A dimers: a distinct biochemical difference between STAT5A and STAT5B. *Mol Cell Biol* 1998; 18(10):5852-5860.
- (107) Wang Y, Robledo O, Kinzie E, Blanchard F, Richards C, Miyajima A et al. Receptor subunit-specific action of oncostatin M in hepatic cells and its modulation by leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem* 2000; 275(33):25273-25285.
- (108) Weber MM, Michl P, Auernhammer CJ, Engelhardt D. Interleukin-3 and interleukin-6 stimulate cortisol secretion from adult human adrenocortical cells. *Endocrinology* 1997; 138(5):2207-2210.
- (109) Wen Z, Darnell JE, Jr. Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(11):2062-2067.
- (110) Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997; 53(3):451-465.
- (111) Wyllie AH, Bellamy CO, Bubb VJ, Clarke AR, Corbet S, Curtis L et al. Apoptosis and carcinogenesis. *Br J Cancer* 1999; 80 Suppl 1:34-37.
- (112) Yoshimura A, Ichihara M, Kinjyo I, Moriyama M, Copeland NG, Gilbert DJ et al. Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *EMBO J* 1996; 15(5):1055-1063.
- (113) Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H, Hanson MB, Lioubin MN, Todaro GJ. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(24):9739-9743.
- (114) Zhang F, Li C, Halfter H, Liu J. Delineating an oncostatin M-activated STAT3 signaling pathway that coordinates the expression of genes involved in cell cycle regulation and extracellular matrix deposition of MCF-7 cells. *Oncogene* 2003; 22(6):894-905.
- (115) Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, Willson TA, Zugaro LM, Simpson RJ et al. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(5):2071-2076.
- (116) Zhang JG, Metcalf D, Rakar S, Asimakis M, Greenhalgh CJ, Willson TA et al. The SOCS box of suppressor of cytokine signaling-1 is important for inhibition of cytokine action in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(23):13261-13265.
- (117) Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(11):4806-4810.

- (118) Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 1994; 264(5155):95-98.

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

1. Auernhammer CJ, Kopp FB, Vlotides G, Dorn F, Isele NB, Spottl G, Cengic N, Weber MM, Senaldi G, Engelhardt D. Comparative study of gp130 cytokine effects on corticotroph AtT-20 cells--redundancy or specificity of neuroimmunoendocrine modulators? *Neuroimmunomodulation*. 2004;11(4):224-32.
2. Auernhammer CJ, Dorn F, Vlotides G, Hengge S, Kopp FB, Spoettl G, Cengic N, Engelhardt D, Weber MM. The OSMR/gp130 ligand murine oncostatin M induces apoptosis in adrenocortical Y-1 tumor cells. *J Endocrinol*. 2004 Mar;180(3):479-86
3. Auernhammer CJ, Kopp FB, Isele N, Dorn F, Weber MM, Senaldi G, Engelhardt D. 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 (Abstract). Meeting of the European Neuroendocrine Association, Munich 2002
4. Auernhammer CJ, Dorn F, Dietrich A, Spoettl G, Weber MM, Engelhardt D. Differential effects of human and murine oncostatin M in corticotroph AtT-20 cells. (Abstract). 83rd Annu Meet Endocr Soc, Denver 2001; P2-328
5. Auernhammer CJ, Dorn F, Dietrich A, Engelhardt D, Weber MM. Effects of murine oncostatin M in adrenocortical Y-1 cells. (Abstract). 83rd Annu Meet Endocr Soc, Denver 2001; P2-329

6. Auernhammer CJ, Dorn F, Dietrich A, Engelhardt D, Weber MM.

Murine oncostatin M stimulates corticosterone secretion in murine adrenocortical Y-1 cells.

(Abstract). 45th Symposium DGE - Exp Clin Endocrinol Metab 2001; 109(Suppl1):S19.

7. Kolloquium endokrinologischer Methoden, Medizinische Klinik des Klinikums Innenstadt der LMU München, 2001. Effekte von Oncostatin M an der Hypophysen-Nebennierenrinde

8. DGE Junge Forschung aktiv, 3. Perspektivenkonferenz der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie in Marburg, 2001. Role of OSMreceptor/gp130 and LIFreceptor/gp130 complex in HPA – axis signaling

7. Lebenslauf

Name

Franziska Dorn

Persönliches

geboren am 10.11.1976 in München, ledig

Schulausbildung

06/1996 Abitur am musischen Pestalozzi-Gymnasium (Note 1,6)

Studium

05/1997-05/2003 Studium der Humanmedizin an der LMU München (Gesamtnote „sehr gut“)

03/1999 Physikum (Note 2,66)

03/2000 I. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)

04/2002 II. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,66)

04/2003 III. Abschnitte der Ärztlichen Prüfung (Note 1,0)

Auslandsaufenthalt

09/2000 Famulatur Gynäkologie und Geburtshilfe, Cebu, Philippinen

Praktisches Jahr

05 – 08/2002 Innere Medizin (Hämatologie und Onkologie), Krankenhaus Schwabing, München

08 – 11/2002 Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinikum Großhadern, LMU, München

11/2002 – 02/2003 Neurochirurgie und Thoraxchirurgie, Klinikum Großhadern, LMU, München

Beruf

seit 07/2003 Ärztin im Praktikum, Abteilung für Neurologie, Krankenhaus Bogenhausen, München

seit 10/2004 Assistenzärztin, Abteilung für Neurologie, Krankenhaus Bogenhausen, München

8. Danksagung

Mein Dank gilt:

Herrn Dr. med. C. J. Auernhammer für die engagierte und hervorragende Betreuung und Unterstützung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. D. Engelhardt für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in der endokrinologischen Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik II des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Professor Dr. med. K. Parhofer für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Herrn G. Spöttl, Frau B. Adelman, Frau N. Cengic und Frau S. Hengge für die hilfreiche Anleitung und Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Frau A. Dietrich, Herrn F. Kopp und Herrn G. Vlotides für die kollegiale Zusammenarbeit.