

**Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik II
am Klinikum Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke

**Interleukin-11 – analog zu Interleukin-6 –
ein direkter Modulator der Nebennierenrinde:
In vitro Versuche mit Interleukin-11 und Interleukin-6 an der
murinen Nebennierenrinde und der adrenokortikalen
Tumorzelle Y-1**

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

**vorgelegt von
Annette Siegmund geb. Dietrich
aus Achern**

2008

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. D. Engelhardt

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. B. Otto

**Mitbetreuer durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. C. J. Auernhammer**

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	3
1. Einleitung	4
1.1 Die gp130 Zytokin Familie.....	4
1.2 Funktion von Interleukin-11 und 6.....	8
1.3 Interleukin-6.....	10
1.3.1 Genlokus.....	10
1.3.2 Proteinstruktur.....	10
1.4 Interleukin-11.....	11
1.4.1 Genlokus.....	11
1.4.2 Proteinstruktur.....	12
1.5 Der α -Rezeptor von Interleukin-6 und 11.....	15
1.6 Die Jak-STAT-Kaskade.....	17
1.6.1 Jak: Januskinasen.....	17
1.6.2 Die Jak-STAT-Kaskade.....	18
1.6.3 STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription.....	20
1.6.4 Regulation der Jak-STAT-Kaskade.....	22
1.7 SOCS: Suppressor of Cytokine Signaling.....	24
1.7.1 Klassifizierung der SOCS-Proteine.....	24
1.7.2 Inhibierung der Jak-STAT-Kaskade durch SOCS.....	25
1.7.3 Regulation der SOCS-Genexpression.....	26
1.8 Der Ras-MAP-Kinase Signalweg.....	27
1.9 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-(HHN)- Achse.....	28
1.10 Fragestellung und Zielsetzung.....	31
2. Material und Methoden	32
2.1 Material.....	32
2.1.1 Zellkultur.....	32
2.1.2 RT-PCR.....	33
2.1.3 Radioimmuno-Assay.....	34
2.1.4 Western Blot.....	35
2.1.5 Luciferase-Assay.....	37
2.1.6 Northern Blot.....	37
2.1.7 Stabile Calcium-Phosphat-Transfektion.....	38
2.2 Methoden.....	39
2.2.1 Zellkultur.....	39
2.2.2 RT-PCR.....	41
2.2.3 Messung der Steroidkonzentration mittels Radioimmuno-Assay.....	45
2.2.4 Western Blot.....	47
2.2.5 Luciferase-Assay.....	49
2.2.6 Northern Blot.....	52
2.2.7 Stabile Calcium-Phosphat-Transfektion.....	53

3. Ergebnisse	55
3.1 <i>Nachweis von gp130- und IL-11-Rezeptor in Nebennierenrindenzellen</i>	55
3.1.1 gp130- und IL-11R-Nachweis mittels RT-PCR in Y-1 Zellen u. muriner NNR ..	55
3.1.2 Restriktion der RT-PCR-Produkte	56
3.2 <i>Nachweis von IL-11 in Y-1 Zellen und muriner Nebennierenrinde</i>	57
3.3 <i>Interleukin-11 stimuliert die Steroidsekretion von murinen NNR-Zellen</i>	58
3.3.1 Dosisabhängige Wirkung von Interleukin-11 auf die Steroidproduktion	58
3.3.2 Zeitliche Wirkung von Interleukin-11 auf die Steroidproduktion	60
3.3.3 Synergistischer Effekt von Interleukin-11 und ACTH auf die Steroidsekretion ..	62
3.4 <i>Interleukin-6 stimuliert die Steroidsekretion von murinen NNR-Zellen</i>	63
3.4.1 Dosisabhängige Wirkung von Interleukin-6 auf die Steroidproduktion	63
3.4.2 Zeitliche Wirkung von Interleukin-6 auf die Steroidproduktion	65
3.5 <i>Interleukin-11 und 6 aktivieren die Jak-STAT-Kaskade in NNR-Zellen</i>	66
3.5.1. Interleukin-11 und 6 aktivieren p-STAT3 in murinen Y-1 NNR-Zellen	66
3.5.2 Interleukin-6 aktiviert p-STAT1 in murinen Y-1 NNR-Zellen.....	67
3.5.3 Interleukin-6 aktiviert p-STAT5 in murinen Y-1 NNR-Zellen.....	67
3.6 <i>Interleukin-11 und 6 aktivieren den Ras-MAP-Kinase-Signalweg</i>	68
3.7 <i>Aktivierung des SOCS-3 Promotors durch Interleukin-11 und 6.....</i>	69
3.8 <i>IL-11 und 6 induzieren die Expression von mSOCS-3 in Y-1 Zellen</i>	71
3.9 <i>SOCS-3-Überexpression in Y-1 NNR-Zellen.....</i>	72
4. Diskussion	74
5. Zusammenfassung.....	85
6. Literaturverzeichnis.....	87
7. Danksagung.....	98
8. Lebenslauf.....	99

Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CBM	Cytokine Binding Module
CIS	Cytokine-inducible-SH2-domain-containing Protein
CNTF	Ciliary Neurotrophic Faktor (Zytokin der gp130-Familie)
CRH	Corticotropes Releasing Hormon
CT-1	Cardiotrophin-1 (Zytokin der gp130-Familie)
CTC	Cardiotrophin-like Cytokine (Zytokin der gp130-Familie)
DDT	Dichlor-Diphenyl-Trichloräthan
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylen-Diamine-Tetraacetic-Acid
EPO	Erythropoetin
FNT-III	Fibronectine Type III
g	Gravitationskonstante g
G-CSF	Granulozytenkolonie stimulierender Faktor
GH	Growth Hormone = Wachstumshormon
gp130-R	gp130-Rezeptor
GTP	Guanidin-Tri-Phosphat
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-x, z.B. IL-6	Interleukin-x, z.B. Interleukin-6
IL-x-R, z.B. IL-6-R	Interleukin-x-Rezeptor, z.B. Interleukin-6-Rezeptor
Jak	Januskinasen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
LIF	Leukaemia Inhibitory Factor (Zytokin der gp130-Familie)
NNR	Nebennierenrinde
NNT-1/BSF3	Novel Neurotrophin1/B-cell-stimulating Factor 3 (Zytokin d. gp130-F.)
NP	Neuropoietin (Zytokin der gp130-Familie)
ORF	Open reading frame
OSM	Onkostatin M (Zytokin der gp130-Familie)
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POMC	Poopiomelanocortin
RIA	Radio-Immunoassay
RT	Reverse Transkription
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SHP2	SH2-domain-containing tyrosine phosphatase
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TNF	Tumor Nekrose Faktor

1. Einleitung

Ein sehr interessantes Gebiet der medizinischen Grundlagenwissenschaft ist das der Zytokine und Interleukine. Die komplexe Funktionsweise der Zytokine bei neuroimmunologischen und endokrinologischen Vorgängen ist bisher nur unzureichend erforscht.

Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Modulation der Stressantwort der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und wirken sowohl auf hypothalamisch/hypophysärer als auch direkt auf adrener Ebene (Bornstein et al., 2004).

Vorliegend sollen die Effekte von Interleukin-11 (IL-11) auf die Steroidsynthese der Nebenniere untersucht werden. Interleukin-11 ist ein Mitglied der gp130-Rezeptorfamilie, welche für ihre neuroendokrinologische Funktion an der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-(HHN)-Achse bekannt ist. Für Interleukin-11 ist bisher nur eine modulatorische Wirkung auf Hypothalamus- und Hypophysen-Ebene bekannt. Ebenso sind bisher sein signaltransduzierender Rezeptorkomplex und der intrazelluläre Signalweg noch unzureichend erforscht. Interleukin-6 (IL-6) scheint dem Interleukin-11 in seiner Funktion und Wirkungsweise sehr ähnlich zu sein; für Interleukin-6 ist die Rolle bei der Steroidsynthese der Nebenniere gut untersucht (Bornstein et al., 2004). Aus diesem Grund wird das Interleukin-6 in dieser Arbeit als Vergleichsparameter für neue Erkenntnisse über das Interleukin-11 verwendet.

Es wird gezeigt, dass Interleukin-11 ebenso wie Interleukin-6 eine direkte Wirkung auf die Nebennierenrinde hat.

Um die Interleukine-6 und 11 in die Klassifikation der Zytokine einordnen zu können, soll zuerst die Klassifizierung der Zytokine sowie ihre Einteilung nach Rezeptoren dargestellt werden.

1.1 Die gp130 Zytokin Familie

In dieser Arbeit soll das Zytokin Interleukin-11, das zu der gp130-Rezeptor-Familie gezählt wird, näher klassifiziert werden. Die gp130-Rezeptor-Familie wird auch Interleukin-6-Familie genannt. Zu dieser Familie zählen bisher Interleukin-6 (IL-6), Leukaemia Inhibitory Factor (LIF), Oncostatin M (OSM), Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) und Cardiotrophin-1 (CT-1). In den letzten Jahren sind noch zwei weitere Mitglieder der IL-6-Familie entdeckt worden. Zum einen wurde das Novel Neurotrophin1/B-cell-stimulating factor 3 (NNT-1/BSF3)

gefunden, das erstmals von Senaldi et al (1999) beschrieben wurde und unabhängig davon zur gleichen Zeit als Cardiotrophin-like Cytokine (CTC) von Shi et al (1999) entdeckt wurde. Zum anderen wurde das bisher jüngste Mitglied der Interleukin-6-Familie von Derouet et al. 2004 als Neuropeitin (NP) beschrieben (Derouet et al., 2004; Vlotides et al., 2004).

Zytokine sind lösliche Proteine unterschiedlicher Größe, die von Zellen sezerniert werden. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Zellinteraktion, Zellkommunikation und der zellulären Immunantwort. In einigen Fällen wie z.B. den Zytokinen LIF, IL-6 und IL-11 wirken sie auch auf (neuro)endokrine Weise. Obwohl sie nicht zu den Hormonen gezählt werden, da sie nicht von Drüsenzellen produziert und sezerniert werden, können sie eine parakrine oder autokrine Wirkung erzielen und durch Aktivierung hormonproduzierender Organe, wie der Hypophyse oder der Nebennierenrinde, auf verschiedene hormonale Kreisläufe Einfluss nehmen.

Die Zytokine werden kurzfristig durch Stimulation in verschiedenen Zellarten synthetisiert und in nano- bis pikomolarer Konzentration ausgeschüttet. Sie erreichen schon nach kurzer Zeit ihr Wirkmaximum und interagieren in verschiedenen Zielgeweben sowohl synergistisch, additiv als auch antagonistisch. Durch ihre pleiotrope Funktion wirken mehrere Zytokine oft additiv auf dasselbe Zielgewebe.

Die zelluläre Antwort auf die Zytokine in einer auto-, para- oder endokrinen Art ist abhängig vom Vorhandensein spezifischer Oberflächenrezeptoren der Zielzellen, die die intrazelluläre Signaltransduktion über bestimmte Pathways vermitteln.

Man versucht, die Zytokine in verschiedene Klassen einzuteilen, um eine gewisse Systematik in die Vielzahl der Botenstoffe zu bringen. Die Einteilung nach ihrer Wirkung über Oberflächenrezeptoren erfolgt in Klasse I und II Rezeptor Zytokine sowie in die Immunglobulin-Rezeptor Superfamilie und die TNF-Rezeptor Familie. Die Gemeinsamkeit der einzelnen Zytokin-Rezeptorklassen liegt im Aufbau der Rezeptorstruktur und der Bindungsstelle für die Liganden am Rezeptor (Kurth et al., 1999; Taga, 1996).

Zytokine einer Familie benutzen meist gleiche Oberflächenrezeptoren oder zumindest gleiche Rezeptoruntereinheiten. Dies gilt auch für die Interleukin-6-Familie, die zu den Klasse-I-Rezeptor-Zytokinen gezählt wird.

Die Klasse-I-Zytokinrezeptoren zeichnen sich durch eine gemeinsame "cytokine binding module"(CBM)-Region am extrazellulären Rezeptoranteil aus. Die CBM-Region enthält zwei "fibronectin type III" Module (FNT-III). Charakteristischer Weise enthält das proximale FNT-III insgesamt vier konservierte Cysteinbausteine am N-terminalen Ende, das distale FNT-III beinhaltet eine WSXWS- (Trp-Ser-X-Trp-Ser) Region am C-terminalen Ende (Abb. 1). Zusätzlich gibt es an den extrazellulären Rezeptoranteilen proximal der CBM-Region noch

eine unterschiedliche Anzahl weiterer FNT-III-Module und distal unterschiedlich große Immunglobulin-ähnliche Regionen (Ig-like domaine).

Schematische Darstellung der IL-6-Rezeptor-Familie

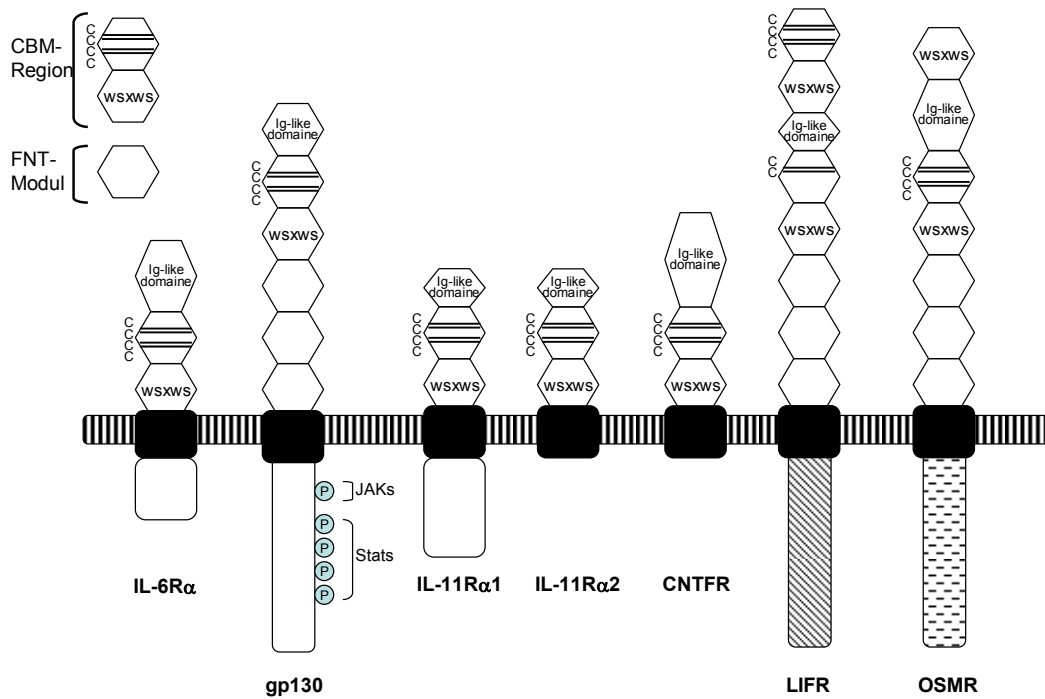


Abb. 1: Deutlich wird in diesem Schema die Zusammengehörigkeit der einzelnen Rezeptoren der Interleukin-6-Familie durch den ähnlichen Aufbau des extrazellulären Rezeptoranteils. Der extrazelluläre Rezeptor enthält immer die "cytokine binding module" (CBM)-Region. Diese besteht aus zwei "fibronectin type III"-Modulen (FNT-III) mit insgesamt vier konservierten Cysteinebausteinen am N-terminalen Ende und einer WSXWS- (Trp-Ser-X-Trp-Ser) Region am C-terminalen Ende. Distal kommen „immunglobulin-ähnliche Regionen“ (Ig-like domaine) vor, die sich von Rezeptor zu Rezeptor in ihrer Größe unterscheiden. Proximal der CMB-Region können weitere FNT-III-Module liegen (Eigene Abbildung nach Taga & Kishimoto und Arzti)

Die Informationsübertragung erfolgt immer über den gp130-Rezeptor. Allerdings ist die Dimerisation der Rezeptoruntereinheiten uneinheitlich und von der jeweiligen Ligandenbindung abhängig.

IL-6 und -11 binden an ihren jeweiligen spezifischen Rezeptor, die Rezeptor- α -Kette IL-6-R α bzw. IL-11-R α 1/2. Sie induzieren dadurch eine Homodimerisation von zwei gp130-Molekülen. Der endgültige signaltransduzierende Rezeptorkomplex ist ein Hexamer aus Zytokin : Zytokin-R- α : gp130-R in 2:2:2-Stereometrie (Abb. 2).

LIF bindet an einen heterodimeren Rezeptor bestehend aus einem gp130-R und LIF-R. OSM kann entweder an den gp130-R binden und eine Heterodimerisation zwischen dem gp130-R und dem LIF-R bewirken oder es bindet fakultativ an seinen spezifischen OSM-R β und

induziert dadurch eine heterodimere Verbindung mit dem gp130-R (Abb. 2). Die Signaltransduktion von CT-1 erfolgt über einen heterotrimeren Rezeptorkomplex bestehend aus einem gp130-R, LIF-R und einem noch nicht näher charakterisierten Rezeptor CT-1R. CNTF sowie NNT-1/BSF3 und NP binden an den CNTF-R α und induzieren dadurch eine Heterodimerisation von gp130-R und LIF-R (Auernhammer and Melmed, 2000; Heinrich et al., 1998; Kurth et al., 1999; Vlotides et al., 2004).

Die über den gp130-Rezeptor induzierte Signalkaskade läuft über die Aktivierung von Januskinasen (Jak) und „Signal Transducers and Activators of Transkription“ (STAT) durch Phosphorylierung ab. Anschließend folgt die Translokation der aktivierten STAT-Proteine in den Nukleolus mit dortiger Bindung an DNA-Promotorsequenzen, die die Proteinbiosynthese der Zielproteine in Gang setzen. Gleichzeitig wird die Synthese von Feedbackproteinen aktiviert. Die negative Feedbackhemmung der Zytokinwirkung erfolgt u.a. über „Suppressor Of Cytokine Signaling“ (SOCS)-Proteine oder „Cytokine-inducible-SH2-domain-containing Protein“ (CIS)-Proteine. Sie verhindern die Phosphorylierung von weiteren STAT-Proteinen, um dadurch die Aktivierung der Signalkaskade zu limitieren.

Dieser Pathway nennt sich Jak-STAT-Pathway und wird von unterschiedlichen Zytokinen zur Signaltransduktion benutzt. Dadurch entsteht eine große Variationsmöglichkeit an synergistischen, additiven und hemmenden Effekten variabler Zytokine untereinander bzw. verschiedener Zytokine an dem gleichen Zielgewebe.

Signaltransduzierende Rezeptorkomplexe

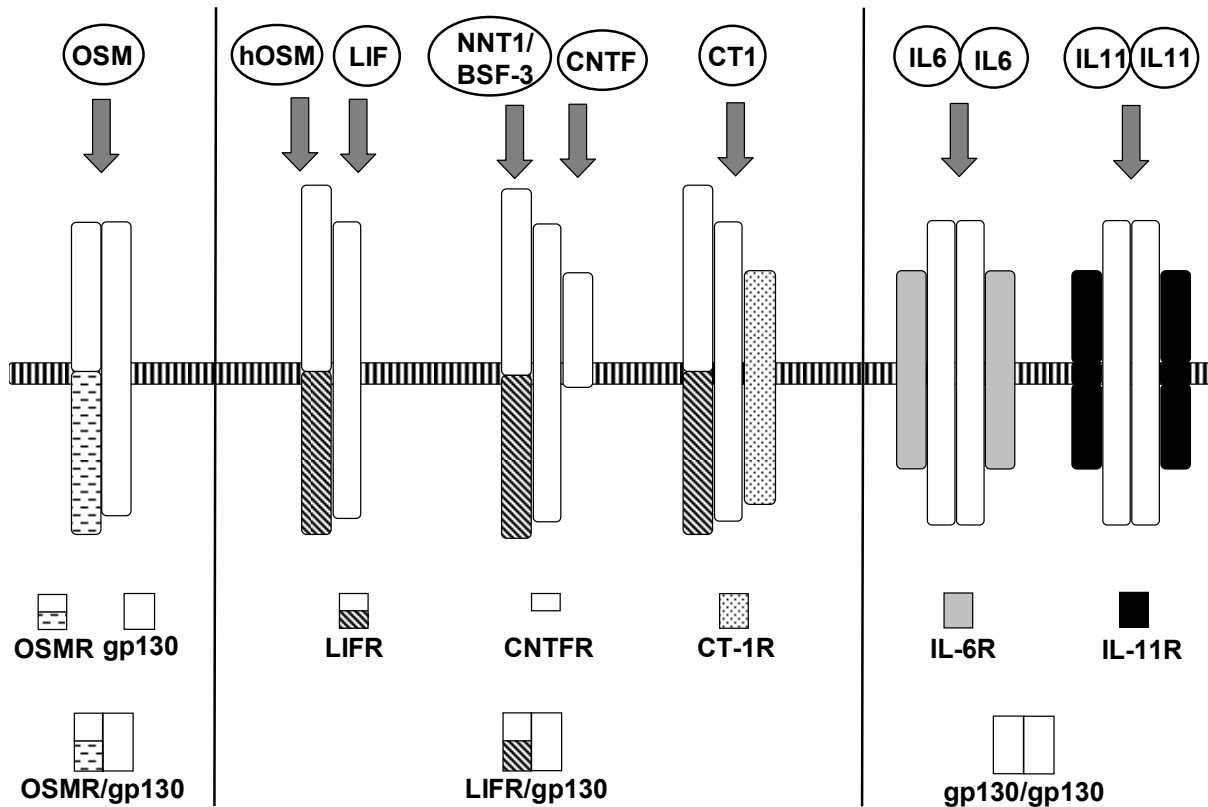


Abb. 2: Die Signaltransduktion und Ausbildung des transduzierenden Rezeptorkomplexes ist abhängig von der spezifischen Ligandenbindung: IL-6 und -11 bewirken eine gp130-R-Homodimerisation und Ausbildung eines Hexamers zur Signaltransduktion. OSM kann zu einer gp130-R/OSM-R-Heterodimerisation führen, oder so wie LIF eine gp130-R/LIF-R-Heterodimerisation bewirken. CNTF und NNT-1/BSF3 induzieren eine gp130-R/LIF-R-Heterodimerisation und bilden anschließend mit dem CNTF-R einen Trimer. Ebenso bewirkt CT-1 die Induktion eines Trimers aus LIF-R/gp130-R und CT-1R. Die Signaltransduktion läuft bei allen Rezeptorkomplexen ausschließlich über den gp130-Rezeptor. (Eigene Abbildung nach Vlotides et al., 2004)

1.2 Funktion von Interleukin-11 und 6

Interleukin-11 und -6 haben eine Reihe von redundanten Effekten gemeinsam.

Beide zeigen einen wachstumsfördernden Effekt auf haematopoetische Stammzellen (Musashi et al., 1991b; Tsuji et al., 1992) und sind in die Haematopoese involviert. Sie erhöhen beide die Proliferationsrate von Megakaryozyten (Musashi et al., 1991b; Musashi et al., 1991a; Tsuji et al., 1992) und Thrombozyten und stimulieren die Erythropoese. Allerdings hat nach bisheriger Erkenntnis nur Interleukin-6 einen Einfluss auf die Makrophagen-differenzierung (Auernhammer and Melmed, 2000). Wachstum und Differenzierung von B-Zellen werden ebenfalls durch beide Interleukine induziert. Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung hat nur Interleukin-6 (Besedovsky and del Rey, 1996; Kishimoto et al., 1992; Yin et al., 1992).

Einen wachstumsfördernden Einfluss auf Myelomzellen haben beide Interleukine (Taga, 1997).

Sowohl Interleukin-6 als auch Interleukin-11 sind an der Akute-Phase-Reaktion bei inflammatorischen Prozessen beteiligt, indem sie Hepatozyten zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen wie Fibrinogen, CRP, Ferritin und Haptoglobin stimulieren (Baumann and Schendel, 1991; Schwertschlag et al., 1999).

Beide Interleukine wirken pro- und antiinflammatorisch in unterschiedlichen Geweben (Gadient and Patterson, 1999). IL-11 reduziert z.B. über Monozyten und Makrophagen die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen (Schwertschlag et al., 1999). Während einer Entzündungsreaktion werden z.B. TNF, IL-1 und zuletzt IL-6 ausgeschüttet. Im Folgenden wirkt Interleukin-6 antiinflammatorisch, indem es die weitere Genexpression von den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 und TNF unterdrückt. IL-6 wirkt gleichzeitig proinflammatorisch, da es die Produktion von Akute-Phase-Proteinen aktiviert und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden(HHN)-Achse zur Steuerung des Entzündungsprozesses stimuliert (Papanicolaou et al., 1998). Interleukin-11 scheint in einer neutropenischen Sepsis eine protektive Funktion einzunehmen (Opal et al., 2003). Beide Interleukine fördern die Osteoklastenformation und die neuronale Differenzierung (Auernhammer and Melmed, 2000).

Interleukine beeinflussen auch epitheliales Gewebe. So wird Interleukin-11 von Alveolar- und Bronchialzellen produziert und spielt eine wichtige Rolle bei pulmonalen inflammatorischen Prozessen. Des Weiteren ist für Interleukin-11 eine Regulatorfunktion der Zellproliferation im Gastrointestinaltrakt entdeckt worden. Es scheint, als hemme es die weitere Proliferation von gesunden intestinalen Epithelien. Sobald jedoch eine Verletzung durch z.B. Strahlenschäden oder Chemotherapie vorhanden ist, fördert IL-11 die epitheliale Proliferation und beschleunigt somit den Heilungsprozess (Schwertschlag et al., 1999; Trepicchio and Dorner, 1998b).

Für beide Interleukine ist eine Beteiligung auf Hypothalamus- und Hypophysen-Ebene bekannt (Chesnokova and Melmed, 2002; Gerez et al., 2007). Allerdings ist bisher nur für Interleukin-6 eine Wirkung auf die Nebennierenrinde beschrieben worden (Bornstein et al., 2004).

1.3 Interleukin-6

1.3.1 Genlokus

Entdeckt wurde Interleukin-6 als B-Zell stimulierender Faktor BSF-2 durch Hirano et al. 1986 (Hirano et al., 1986). 1989 entschlüsselten Hirano T. et al. die Aminosäuresequenz des 184-Aminosäure großen Proteins Interleukin-6 (Hirano et al., 1989). Das humane Interleukin-6-Gen ist auf dem Chromosom 7p21-p14 lokalisiert und ist ca. 5 Kilobasen (kb) lang. Es besteht aus fünf Exons und vier Introns (Papanicolaou et al., 1998). In der Promotorregion der IL-6-mRNA liegen Erkennungsstellen u.a. für die Transkriptionsfaktoren NF-IL6 und auch NF- κ B, die die Transkriptionsrate von Interleukin-6 regulieren. Eine AP-1-Bindungsstelle ist ebenfalls vorhanden (Papanicolaou et al., 1998).

Das Interleukin-6 wird zunächst als ein Vorläuferprotein mit 212 Aminosäuren (AS) synthetisiert. Die sezernierte Form beinhaltet 184 Aminosäuren. Die unterschiedlichen Molekülmassen von 21 – 28 kDa beruhen auf posttranslationalen Veränderungen durch Glykosylierungen und Phosphorylierungen. Das unveränderte Protein hat eine Masse von 20,8 kDa (Heinrich et al., 1998; Rose-John et al., 1993).

Murines und humanes Interleukin-6 zeigen eine Homologie von 65% auf DNA-Ebene und von 41% auf Proteinebene (Chiu et al., 1988).

1.3.2 Proteinstruktur

Genauso wie die anderen Zytokine der Interleukin-6-Familie ist auch das Interleukin-6 ein Vier- α -Helix-Protein und besteht aus vier langen alpha-Helices die durch Loops miteinander verbunden sind. Durch Mutagenesestudien konnten an charakteristischen Oberflächenstrukturen der Interleukin-6-Zytokine drei charakteristische Rezeptorbindungsstellen aufgedeckt werden. Die einzelnen Bindungsstellen und die dafür verantwortlichen Aminosäurereste konnten am Beispiel von Interleukin-6 genau klassifiziert werden (Xu et al., 1997).

Die *Rezeptor-Bindungsstelle-1* formiert sich durch das C-terminale Ende der Helix D und den C-terminalen Teil des AB-Loops. Sie ist die Bindungsstelle für den spezifischen Interleukin-6- α (Kurth et al., 1999). Aus Aminosäureresten in der Mitte der Helix A und der Helix C bildet sich die *Rezeptor-Bindungsstelle-2*, die bei allen Zytokinen der Interleukin-6-Familie als Bindungsstelle für den gp130-Rezeptor fungiert (Somers et al., 1997). Die *Rezeptor-Bindungsstelle-3* bildet sich unter anderem aus Resten am Ende des CD-Loops und des N-terminalen Endes an der Helix D und am AB-Loop. Sie ist für die Bindung eines weiteren

Rezeptors verantwortlich. Abhängig vom Zytokin bindet an die Rezeptor-Bindungsstelle-3 entweder ein gp130-R, wie bei Interleukin-6 und -11, oder es bindet ein LIF- bzw. OSM-Rezeptor, wie es bei anderen Zytokinen der Fall ist (Heinrich et al., 1998). Verschiedene Aminosäurereste auf der D-Helix des Interleukin-6 sind an der Bindung des gp130-Rezeptors über die „Ig-like-Domäne“ beteiligt (Kurth et al., 1999; Somers et al., 1997).

Nach Assoziation des IL-6/IL-6-R-Komplexes an den gp130-Rezeptor kommt es zu einer Bindung an einen weiteren IL-6/IL-6-R/gp130-R-Komplexes durch Homodimerisation der gp130-Moleküle, die die Signaltransduktion in die Wege leiten.

1.4 Interleukin-11

1.4.1 Genlokus

Das humane Interleukin-11 wurde erstmals 1990 als eine weitere Aktivität - neben dem bekannten Interleukin-6 - im Medium einer durch IL-1 stimulierten Knochenmarkszelllinie von Primaten, PU-34, von Paul SR et al. entdeckt. Es stellte sich als eine Aktivität im Medium dar, die ähnlich wie das IL-6 eine Proliferation von murinen Plasmazytomzellen, T1165, induzieren konnte (Paul et al., 1990). Trotzdem die cDNA des Interleukin-11 auf Grund einer dem Interleukin-6 ähnlichen Bioaktivität entdeckt werden konnte, ließ sich keine Homologie zwischen IL-6 und -11 sowohl auf DNA-Ebene als auch auf Aminosäure-Ebene feststellen (Du and Williams, 1994). Das humane Gen für Interleukin-11 liegt auf dem Chromosom 19 an der Bande 19q13.3 bis 19q13.4 und ist 7 kb lang. Es enthält, wie auch das murine Gen für Interleukin-11, fünf Exons und vier Introns (Ohsumi et al., 1991). Der Genlokus des murinen IL-11 liegt auf den Mikrosateliten D7Mit57 und D7Mit28 des proximalen Chromosoms 7. Das Ergebnis stimmt mit der Entdeckung von anderen Genen überein, die bei der Maus auf den Mikrosatelliten des Chromosom 7 zu finden sind und beim Menschen auf Chromosom 19q13 (Morris et al., 1996).

In der Nukleotidsequenz des humanen IL-11-Gens befindet sich u.a. ein langes „open reading frame“ (ORF) von 597 bp. Das ORF kodiert ein 199-Aminosäure-Protein, das dem Interleukin-11-Vorläuferprotein entspricht (Paul et al., 1990). In der Maus konnten Morris et al. 1996 auch ein „open reading frame“ identifizieren. Es ist 600 bp lang und kodiert ebenfalls das 199-AS-lange IL-11-Vorläuferprotein.

Die humane und murine Nukleotidsequenz von Interleukin-11 stimmen zu 80% überein. Auf der Aminosäureebene existiert eine 88%ige Homologie zwischen dem humanen und dem murinen IL-11 (Du and Williams, 1997).

Weitere Untersuchungen der Genomstruktur des humanen Interleukin-11 erbrachten den Nachweis von DNA-Sequenzen, die zur Transkriptionskontrolle des Gens notwendig sind. Sie liegen am 5'-terminalen Ende der DNA. Eine TATA-ähnliche Region, TATATAA, mit einer 10 bp langen Sequenz, 5'-GGTGAGTCAG-3', liegt z.B. 180 Nukleotide vor dem Startcodon. Sie entspricht der Aktivator-Protein-1(AP-1)-Bindungsstelle (McKinley et al., 1992). Hier kann der Transkriptionsfaktor JunD binden. Der AP-1/JunD-Komplex ist ein wichtiger Kontrollfaktor der basalen IL-11-Transkription in Knochenmarksfibroblasten (Yang and Yang, 1994). Auf mRNA-Ebene sind sog. ATTTA-Motifs bekannt. Sie fungieren als RNA-Destabilisierungssequenzen, um einen begrenzten basalen Transskriptionslevel von IL-11 zu garantieren. Durch Bindung von Phosphorproteinen an diese Sequenzen kann wiederum eine mRNA-Stabilisierung erreicht werden. IL-1 α kann über diesen Mechanismus eine erhöhte Transkriptionsrate von IL-11 induzieren (Yang and Yang, 1994).

1.4.2 Proteinstruktur

Das Interleukin-11 besteht aus 178 Aminosäuren (AS) und ist wie alle Zytokine der Interleukin-6-Familie ein Vier- α -Helix-Protein. Von den 199 AS in der Primärstruktur des Interleukin-11-Vorläuferproteins kodieren 21 AS für eine Leader-Sequenz. Diese wird nicht translatiert (Morris et al., 1996; Ohsumi et al., 1991).

Die Tertiärstruktur sowohl des murinen (Morris et al., 1996) als auch des humanen IL-11 ist reich an Prolinresten (12%) und Leucinresten (23%). Sie enthält andere positiv geladenen Aminosäure-Reste zu 14%. Allerdings gibt es keine Cysteinreste und keine N-terminalen Glykosylierungen wie es das Interleukin-6 aufweist (Schwertschlag et al., 1999; Yang and Yang, 1994).

An der Oberfläche der Vier-alpha-Helix konnten Bereiche festgestellt werden, die für die Bioaktivität verantwortlich sind. Durch die chemische Modifizierung von Methionin- (Met⁵⁸) und Lysinresten (Lys⁴¹ und Lys⁹⁸) konnten Czupryn et al. 1995 nachweisen, dass diese zum grossen Teil für die Bioaktivität des Interleukin-11 verantwortlich sind (Czupryn et al. 1995a). Die terminalen Carboxylreste beeinflussten die Bioaktivität ebenfalls positiv. Durch Deletion der vier terminalen Carboxylreste reduzierte sich die Bioaktivität z.B. um das 25fache. Nach einer Deletion von acht und mehr terminalen Carboxylresten war keine Aktivität des IL-11 mehr nachzuweisen (Czupryn et al., 1995b). Somit lag die Vermutung nahe, es handle sich dabei um Aminosäurereste, die Teile von Rezeptorbindungsstellen sind.

Die Rezeptorbindungsstellen von humanem Interleukin-11 konnten an der Oberfläche des Proteins identifiziert werden (Abb. 3). Auf dem C-terminalen Ende der Helix D des

rekombinanten humanen IL-11 befand sich die *Rezeptor-Bindungsstelle-1*. Sie fungierte für die Bindung an den spezifischen Interleukin-11-Rezeptor- α (IL-11-R α). Nach Czupryn et al. (1995b) sind die Aminosäuren Arg¹⁵⁰, His¹⁵³, Asp¹⁶⁴, Trp¹⁶⁵, Arg¹⁶⁸ und Met⁵⁸ maßgeblich an der Formation der Rezeptor-Bindungsstelle-1 beteiligt. Tacke et al. hatten 1999 durch Mutagenesestudien ebenfalls beweisen können, dass humanes IL-11 über die Rezeptor-Bindungsstelle-1 an den IL-11-R α bindet. Die Rezeptor-Bindungsstelle-1 wird durch AS-Reste auf der D-Helix und des AB-Loops definiert (Abb. 3). Die Modifizierung von zwei AS-Resten auf der Helix D (R190E, L194D) und einem AS-Rest (L85D) des AB-Loop führte zu einer deutlichen Reduktion der IL-11-Bioaktivität (Tacke et al., 1999).

Ein Teil der *Rezeptor-Bindungsstelle-2* des humanen Interleukin-11 liegt zwischen den Aminosäuren Pro¹³ und Lys⁴¹ auf der Helix C. Für die Rezeptor-Bindungsstelle-2 ist eine Bindung an den gp130-R postuliert worden (Czupryn et al., 1995a; Czupryn et al., 1995b; Grosfeld et al., 1999; Tacke et al., 1999). Tacke et al. (1999) konnten dies allerdings nicht bestätigen. AS-Mutationen an der Rezeptor-Bindungsstelle-2, die auf der Helix A und C liegen sollten, ergaben keine geringere Bioaktivität des IL-11. Es zeigte sich im Gegenteil eine höhere IL-11-Aktivität durch die Mutation des AS-Restes R125E auf der Helix C. Ursache hierfür schien die Bindung an einen löslichen gp130-R zu sein.

Für die o.g. Diskrepanzen gibt es zwei Erklärungen. Entweder liegen die verantwortlichen Reste für die Bindung an den gp130-R an anderen als bisher postulierten Stellen oder die Bindung zwischen der Rezeptor-Bindungsstelle-2 und dem gp130-R ist von geringer Spezifität und Affinität, so dass sie die Bioaktivität gering bis gar nicht beeinflusst.

Für die *Rezeptor-Bindungsstelle-3* des humanen IL-11 liegen die an der Bindung beteiligten Aminosäure-Reste am Anfang der Helix D und dem AB-Loop (Abb. 3). Durch Zerstörung dieser hydrophoben AS-Reste ergab sich eine IL-11-Mutante mit einer sehr stark reduzierten Bioaktivität. Eine Bindung an den IL-11-R α war noch möglich, allerdings erfolgte keine Bindung mehr an den gp130-R. Die Schlussfolgerung war, dass die Rezeptor-Bindungsstelle-3 für den gp130-R kodiert. (Tacke et al., 1999). Da zwei Rezeptor-Bindungsstellen (2 + 3) an der Bindung mit einem gp130-Molekül beteiligt sind, stellte sich die Frage, ob es eine Bindung an dasselbe gp130-Molekül war, oder ob es zwei verschiedene gp130-R sind – wie auch für IL-6 beschrieben. Auf Grund der Stereometrie und der dreidimensionalen Struktur von Interleukin-11 ist sicher, dass die Bindung an zwei verschiedene gp130-R erfolgen muss (Abb. 3 + 4) (Barton et al., 2000).

Anhand der o.g. Mutagenesestudien und auf Grund der Stereometrie des Interleukin-11 (Barton et al., 1999) wird angenommen, dass der signaltransduzierende Rezeptorkomplex ein

Hexamer ist, bestehend aus IL-11:IL-11R α :gp130-R in 2:2:2-Formation. Diese hexamerische Konfiguration wurde auch für Interleukin-6 beschrieben (Ward et al., 1996).

Dreidimensionale Struktur des humanen Interleukin-11

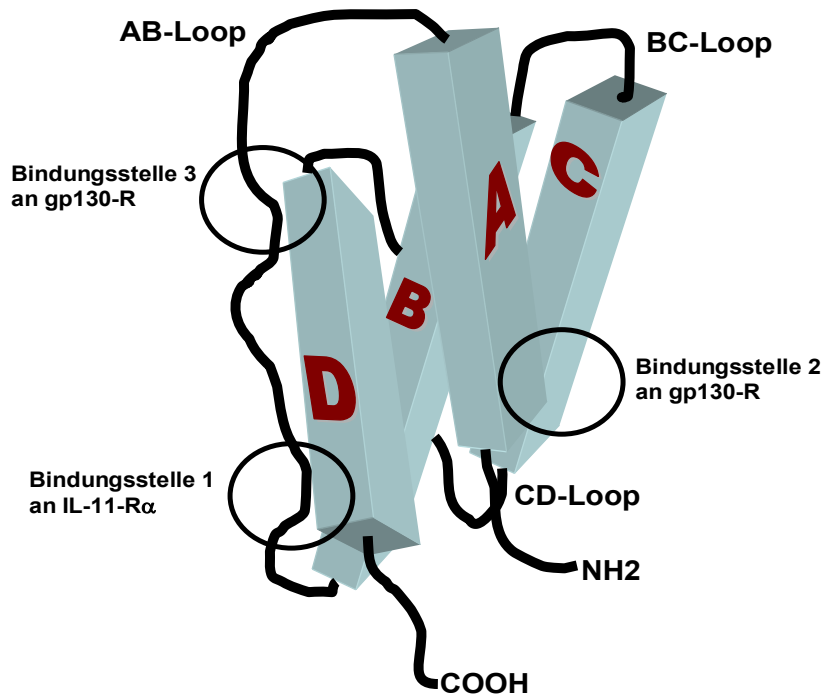


Abb. 3: Schematische Darstellung des humanen IL-11 in seiner dreidimensionalen Struktur. Eingezeichnet sind die Rezeptor-Bindungsstellen 1-3. Für alle gp130-Zytokine sind drei Rezeptorbindungsstellen bekannt. An die Bindungsstelle-1 bindet die für das Interleukin spezifische α -Rezeptoruntereinheit. Sie befindet sich für IL-6 und 11 am C-terminalen Ende der Helix D und des AB-Loops. Die Lokalisation der Bindungsstelle-2 auf den Helices A und C ist konkordant für IL-6 und 11. Sie ist bei allen gp130-Zytokine für die Bindung des gp130-R verantwortlich. Die Bindungsstelle-3 von IL-6 und 11 bindet den gp130-R und befindet sich am Anfang der Helix D und dem AB-Loop. Andere Zytokine binden an dieser Stelle den LIF- oder den OSM-R.. (Eigene Abbildung)

Für das murine IL-11 sind ebenfalls drei Rezeptorbindungsstellen bekannt, die an komplementären Stellen zum humanen IL-11 liegen. Aminosäure-Reste, die hauptsächlich an der Rezeptor-Bindungsstelle-1 für den IL-11-R α beteiligt sind, befinden sich am C-terminalen Ende der Helix D und auf dem AB-Loop. Für die Rezeptor-Bindungsstelle-2 sind Aminosäure-Reste auf den Helices A und C identifiziert worden, die mit den Orten der Rezeptorbindungsstellen des humanen IL-11 und 6 sowie des humanen GH konkludieren. Auch die Rezeptor-Bindungsstelle-3 liegt beim murinen IL-11 an komplementärer Stelle zum humanen Zytokin, nämlich am Anfang der Helix D und dem AB-Loop (Barton et al., 1999). Somit ist ein Vergleich der Tertiärstruktur des humanen und murinen Interleukin-11 möglich.

Die Formation des Interleukin-11-Rezeptorkomplexes als Hexamer ist durch die o.g. Stereometrie des Interleukin-11 und seiner Rezeptorbindungsstellen bedingt.

1.5 Der α -Rezeptor von Interleukin-6 und 11

Obwohl die strukturelle Form der Interleukine 6 und 11 unterschiedlich ist, ähneln sich die Rezeptorkomplexe der Interleukine 6 und 11 sehr stark. Beide Interleukine bilden einen Hexamer bestehend aus zwei Molekülen IL-6 bzw. -11, zwei Molekülen IL-6- bzw. IL-11-R α und jeweils zwei gp130-Molekülen.

Mehrere Studien belegen für beide Zytokine, dass nur die gp130-Komplexe eine signaltransduzierende Funktion besitzen (Taga T., 1992). Die Bindung des Interleukins an seine spezifische α -Rezeptoruntereinheit ist zwar von niedriger Affinität, aber essentiell für die Ausbildung des hexamerischen Rezeptorkomplexes. Die 80 kDa schwere α -Kette des IL-6-R ist jedoch selbst nicht an der Signaltransduktion beteiligt (Taga et al., 1989).

Ward et al. entdeckten 1994 eine lösliche Form des α -Rezeptors für Interleukin-6. Diese kann ebenso wie die membrangebundene Form einen hexamerischen Rezeptorkomplex mit IL-6 und dem gp130-R in 2:2:2-Steometrie eingehen (Ward et al., 1994). Auch für den Interleukin-11 Rezeptor gibt es eine lösliche Variante (Baumann et al., 1996; Curtis et al., 1997). Die löslichen Rezeptoren besitzen keinen membranösen Rezeptoranteil und kommen ubiquitär in der interzellulären Flüssigkeit vor. Die hexamerischen Rezeptorkomplexe mit den löslichen Rezeptoren sind ebenso effizient wie die mit den membrangebundenen (Dahmen et al., 1998). Durch die lösliche Rezeptorkomponente besteht die Möglichkeit des „Trans-Signaling“, d.h. dass die Zytokine ubiquitär an Zellen wirken können, die nur das gp130-Molekül, jedoch nicht die Zytokin-spezifische α -Rezeptoruntereinheit (z.B. IL-6-R α , IL-11-R α) akquirieren. Lösliche Rezeptoren sind für die Interleukine 6 und 11 sowie LIF und CNTF (Lindberg et al., 1998) und für den gp130-R (Tanaka et al., 1999) bekannt.

Der Interleukin-11-Rezeptorkomplex ist ein Hexamer und besteht aus zwei IL-11 und jeweils zwei IL-11- α - und gp130-Rezeptoren (Abb. 4). Genauso wie das Interleukin-6 (Murakami et al., 1993) bindet Interleukin-11 (Yin et al., 1993) seine spezifische α -Rezeptoruntereinheit. Danach folgt eine Homodimerisation von zwei gp130-Rezeptoren. Die membrangebundenen α -Rezeptoren sind nicht an der Signaltransduktion beteiligt und können auch durch lösliche Rezeptoren ersetzt werden (Taga et al., 1989).

Für die IL-11-R α -Untereinheit gibt es zwei verschiedene Isoformen: die IL11-R α 1- und die IL11-R α 2-Untereinheit. Der Unterschied besteht in dem intrazellulären Rezeptoranteil, der nur bei der IL-11R α 1-Untereinheit vorhanden ist (Abb. 1) (Lebeau et al., 1997). Ein funktioneller Unterschied dieser beiden Isoformen ist nicht bekannt. Der humane IL-11-R α 1 ähnelt im Aufbau dem murinen IL-11-R α 1 und dem humanen IL-6-R α . Zwischen dem extrazellulären Anteil des humanen IL-11-R α 1 und des humanen IL-6-R α besteht eine Homologie auf Aminosäureebene von 24% (Lebeau et al., 1997). Der humane IL-11-R α 2 ähnelt wiederum dem CNTF-R α , der ebenfalls keinen intrazellulären Rezeptoranteil besitzt. Der humane IL-11-R α 2 hat eine AS-Homologie von 22% zu dem CNTF-R (Du and Williams, 1997). Robb et al. deckten 1996 die Struktur des murinen IL-11-R auf. Auch bei der Maus konnte die Isoform des IL-11-R α 2 entschlüsselt werden, die eine homologe Sequenz zum murinen IL-11-R α 1 zwischen Exon 2 und 13 aufweist. Der IL-11-R α 2 ist allerdings nur bei wenigen Mäuserassen zu finden (Robb et al., 1996). Da es keinen funktionellen Unterschied zwischen dem IL-11-R α 1 und 2 gibt, wird im Folgenden nur die allgemeine Bezeichnung „IL-11-R“ verwendet.

Die Bindung von IL-11 an den IL-11-R führt zu einem Rezeptorkomplex niedriger Affinität ohne Signaltransduktionsmöglichkeit. Erst die Heterodimerisierung zwischen dem IL-11-R und einem gp130-R führt zu einer hohen Rezeptoraffinität. Sobald IL-11 und IL-11-R eine Einheit bilden, führt das zu einer Heterodimerisation von IL-11-R und einem gp130-R. Der gp130-R geht sofort eine Homodimerisation mit einem weiteren gp130-R/IL-11-R/IL-11-Molekül ein. Erst durch die Homodimerisation der beiden gp130-Moleküle kommt es zu einer suffizienten Einleitung der Signaltransduktion über den hexamerischen IL-11-Rezeptorkomplex (Abb. 4). Es folgt eine Tyrosinphosphorylierung und dadurch eine Aktivierung des gp130-Rezeptors, der zur weiteren Aktivierung der Signalkaskade über die Jak-STAT-Proteine oder über die MAP-Kinasen führt (Arzt, 2001; Du and Williams, 1997).

Durch die oben beschriebene Tertiärstruktur des IL-11 ist der in Abb. 4 schematisch dargestellte Rezeptorkomplex in seinem Aufbau festgelegt. *Es soll untersucht werden, ob die einzelnen Komponenten des IL-11-Rezeptorkomplexes an der Nebennierenrinde nachgewiesen werden können. Denn ohne einen signaltransduzierenden IL-11-Rezeptorkomplex ist eine IL-11-Wirkung auf die NNR unwahrscheinlich bzw. allenfalls über „Trans-Signaling“ mit dem löslichen sIL-11R α erklärbar.*

Signaltransduzierender Interleukin-11-Rezeptor

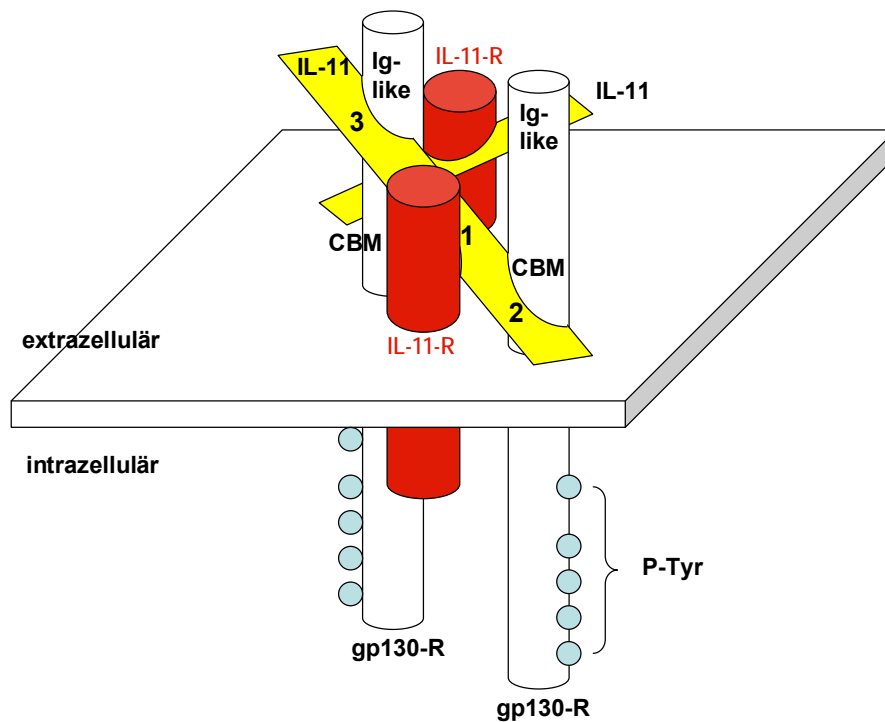


Abb. 4: Der signaltransduktionsfähige Interleukin-11-Rezeptor-Komplex ist hier in einer dreidimensionalen schematischen Abbildung dargestellt. Der Rezeptorkomplex wird aus zwei IL-11-Rezeptoren, zwei gp130-Rezeptoren und zwei Molekülen Interleukin-11 gebildet. Mit den Zahlen 1-3 sind die o.g. Rezeptorbindungsstellen am Interleukin-11 gekennzeichnet. Bindungsstelle-2 und 3 binden jeweils ein unterschiedliches gp130-Molekül. An die Bindungsstelle-1 ist der IL-11-Rezeptor assoziiert. Der intrazelluläre Anteil des Rezeptorkomplexes ist mit den beiden gp130-Rezeptoren und deren Phosphotyrosinstellen für die Signaltransduktion verantwortlich. (Eigene Abbildung)

1.6 Die Jak-STAT-Kaskade

1.6.1 Jak: Januskinasen

Die Jak-STAT-Kaskade ist der übliche intrazelluläre Signalweg von den Zytokinen der IL-6-Familie.

Januskinasen (Jak) sind meist an zytoplasmatische Rezeptoranteile assoziierte Proteine, die einen wichtigen Beitrag zur Signaltransduktion eines Zytokins leisten. Sie haben ein Molekulargewicht von 120-140 kDa und enthalten sieben konservierte JH-Regionen, unter denen zwei kinase-ähnliche Regionen (JH1 und JH2) bekannt sind (Abb. 5). Die JH1-Domäne hat eine katalytische Funktion. Die JH2-Domäne scheint eine pseudokatalytische Funktion zu haben, die allerdings noch nicht näher definiert werden konnte (Arzt, 2001; Imada and

Leonard, 2000). Eventuell ist sie eine Bindungsstelle für STATs (Arzt, 2001;Fujitani et al., 1997). Die N-terminale Region wird durch die „Four-point-one, Ezrin, Radixin and Moesin“ (FERM)-Region bestimmt, die die Unterregionen JH5-7 enthält. Mutagenesestudien an der FERM-Region legen den Verdacht nahe, dass hier die Bindungsstelle liegt, mit der Jaks an den gp130-Rezeptor binden (Heinrich et al., 2003).

Bisher sind vier verschiedene Januskinasen bekannt. Jak 1, 2 und Tyk2 werden in vielen Geweben exprimiert. Jak 3 kommt nur in hämatopoetischen Zellreihen vor (Arzt, 2001;Haan et al., 2006;Heinrich et al., 1998;Imada and Leonard, 2000;Leonard and O'Shea, 1998).

Schematischer Aufbau der Januskinasen

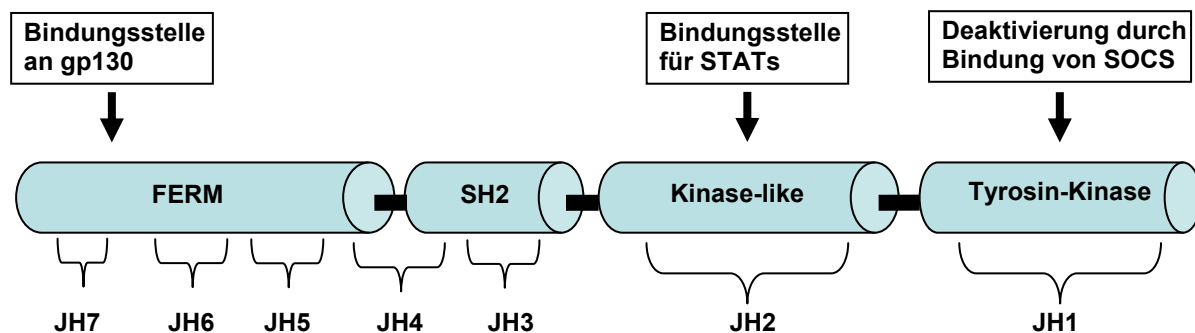


Abb. 5: Januskinasen sind Proteine, die in aktiviertem Zustand zur Signaltransduktion beitragen. Sie sind an zytoplasmatische Rezeptoranteile assoziiert und werden durch Autophosphorylierung aktiviert und anschließend abgespalten. Die Januskinasen enthalten 7 JH-Regionen. JH1 und 2 scheinen eine katalytische Funktion zu haben, wobei für die JH2-Region eine Bindungsstelle an STATs postuliert wird. Auf der FERM-Region scheint die Bindungsstelle zu liegen, mit der JAKs an den gp130-Rezeptor binden. (Eigene Abbildung nach Heinrich et al., 2003)

1.6.2 Die Jak-STAT-Kaskade

Die Bindung eines Liganden an seinen spezifischen Rezeptor führt zu einer Homo- oder Heterodimerisation des gp130-R. Speziell bei IL-11 und IL-6 folgt auf die Ligandenbindung eine Homodimerisation des gp130-Rezeptors.

An die intrazelluläre Domäne des gp130-Rezeptors ständig assoziiert sind die Januskinasen Jak1, Jak2 und Tyk2, die allerdings erst nach Homo- oder Heterodimerisation von gp130 durch Autophosphorylierung aktiviert werden (Ihle and Kerr, 1995).

Die Aktivierung der Januskinasen führt zu einer Phosphorylierung an bestimmten Tyrosinresten der zytoplasmatischen Rezeptoruntereinheit des gp130-Rezeptors, die als Andockstationen für SH2-Domäne enthaltende Transmitter-Proteine dienen. Dieser Bereich

des gp130-R wird als Box 2 klassifiziert und ist seinerseits durch die Tyrosinreste charakterisiert, die in phosphoryliertem Stadium als Bindungsstellen für die zytoplasmatischen Transmitterproteine fungieren (Heinrich et al., 2003; Taga, 1997).

Diese Transmitterproteine werden „Signal-Transducers and Activators of Transcription“ (STAT) genannt. Sie binden an die phosphorylierten Bindungsstellen des gp130-Rezeptors (Box 2), wodurch es zu einer näheren stereometrischen Beziehung zu den Jaks kommt, die dadurch wiederum die STATs phosphorylieren können (Imada and Leonard, 2000). Die tyrosinphosphorylierten STATs sind somit aktiv und formieren sich zu Homo- bzw. Heterodimeren aus verschiedenen STAT-Molekülen. Die aktivierten STAT-Dimere wandern in den Nukleolus. Dort binden sie an Promotorregionen der Zielgene, wodurch die Transkription dieser Gene initiiert wird (Abb. 6).

Es soll untersucht werden, ob IL-11 und 6 an der Nebennierenrinde den Jak-STAT-Pathway benutzen.

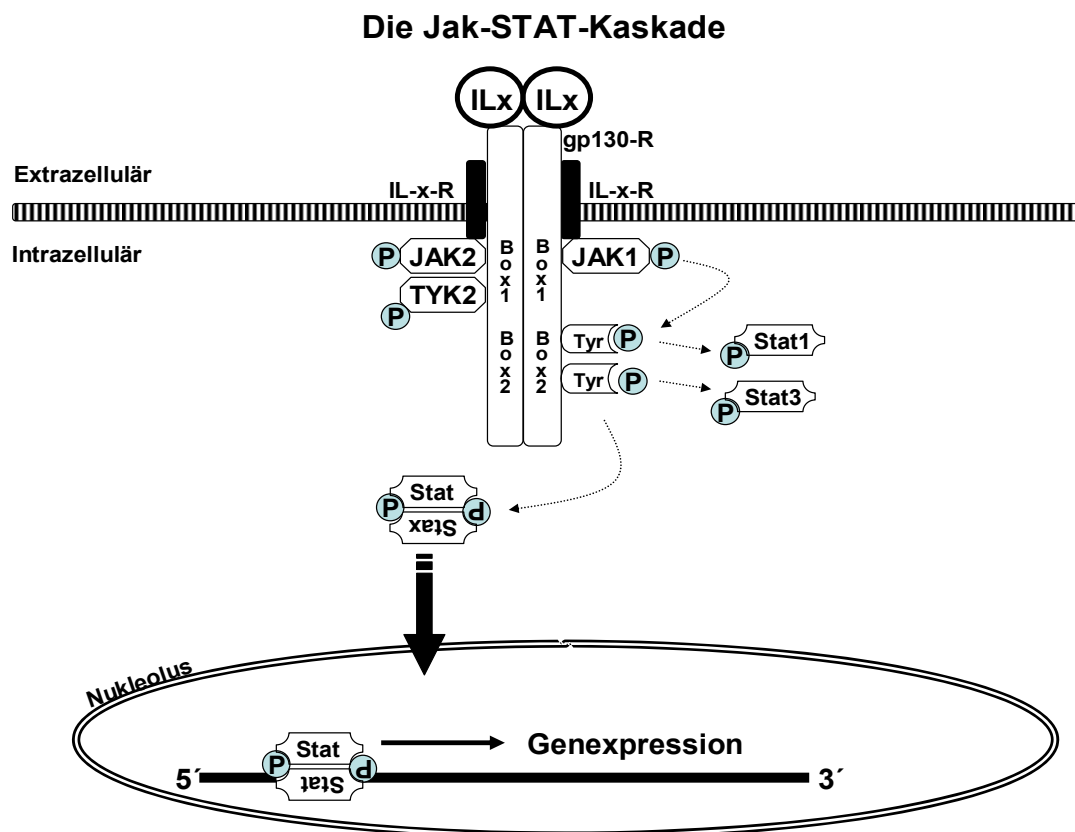


Abb. 6: Die Jak-STAT-Kaskade dient zur Signaltransduktion von einem Interleukin über einen definierten Rezeptorkomplex zur intranukleären Genexpression. Ein Interleukin z.B. Interleukin-11 bindet seinen Interleukin-11-Rezeptor und anschließend einen gp130-R. Danach folgt eine Dimerisierung von zwei gp130-R/IL-11-R/IL-11-Molekülen. An den zytoplasmatischen Anteil der gp130-Rezeptoren gebundene Jaks werden phosphoryliert, so dass STATs an die Jaks binden und dadurch phosphoryliert werden. Die aktivierten STATs formieren sich zu Homo- bzw. Heterodimeren und transfundieren in den Nukleolus. Hier binden sie an bestimmte Promotorregionen der DNS und es erfolgt die Expression der Zielgene. (Eigene Abbildung)

1.6.3 STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription

Bislang kennt man sieben verschiedene STAT-Proteine: STAT1 α , STAT1 β , STAT2, 3, 4, 5 und 6.

Bei den gp130-Zytokinen spielen STAT1, STAT3 und STAT5 eine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion (Heinrich et al., 1998).

STATs sind Proteine von 750 bis 850 Aminosäuren Länge, die eine zentral gelegene konservierte DNA-Bindungsregion (AS 300 – 480) besitzen, eine C-terminal gelegene Transkriptions-Aktivierungs-Domäne (TAD) und eine SH2-Domäne (O'Shea et al., 2002). Über die SH2-Region binden die STATs selektiv an einen aktivierten Rezeptor (gp130-R, LIF-R oder OSM-R), wodurch es zur Phosphorylierung des Tyrosinrestes auf der TAD-Region durch die Januskinasen kommt. In der TAD befinden sich ein konservierter Tyrosin- und ein konservierter Serinrest. Über den Tyrosinrest erfolgt die Phosphorylierung und Aktivierung der STATs. Dem Serinrest wird eine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wie z.B. CBP/p300 zugesprochen (Abb. 7) (Heinrich et al., 2003).

Es gibt STAT-Homodimere und –Heterodimere, deren Ausbildung u.a. von den jeweiligen Zytokinen und ihren Rezeptoren sowie den Zielzellen abhängig ist. Gp130-Zytokine aktivieren vor allem STAT1 und STAT3. Es ist bekannt, dass an einen phosphorylierten LIF-R/gp130-R-Komplex nur STAT1, STAT3 und in wenigen Zelllinien auch STAT5 binden und phosphoryliert werden können (Auernhammer and Melmed, 2000). STAT5 kooperiert vor allem mit dem LIF- und dem OSM-Rezeptor. Der potenteste Aktivator von STAT5 scheint der OSM-Rezeptor zu sein (Heinrich et al., 2003).

Die Tyrosinphosphorylierung findet am C-terminalen Ende von STAT1 an Tyr 701 und von STAT3 an Tyr 705 statt. Die aktivierten STATs lösen sich vom Rezeptor und gehen über den phosphorylierten Tyrosinrest der SH2-Domäne eine Dimerisation mit einem anderen STAT-Molekül ein (Imada and Leonard, 2000; Mikita et al., 1998; O'Shea et al., 2002). Es kommt zu einer Homo- bzw. Heterodimerisation von STAT3-STAT3, STAT1-STAT1 bzw. STAT3-STAT1. Kristalline Strukturanalysen von STAT3 bzw. STAT1-Homodimeren haben gezeigt, dass die Bindung zwischen den STAT-Molekülen an der SH2-Domäne des einen Monomers und dem C-terminalen Phosphotyrosin des anderen stattfindet (Horvath, 2000).

Die dimerisierte Form der STAT-Proteine gelangt auf bisher unbekanntem Wege in den Nukleolus. Diskutiert werden eine Endozytose in den Nukleolus oder ein Ran-abhängiger aktiver Transport in den Zellkern. Eine sog. NLS - nuclear- localisation-sequenz - wie sie bei einigen anderen Proteinen vorkommt und als Erkennungsstruktur für Transportmoleküle

dient, konnte bisher nur bei STAT1 und STAT5 nachgewiesen werden. Möglicherweise besteht auch ein kontinuierlicher Import und Export der STATs zwischen Zytosol und Zellkern (Heinrich et al., 2003).

Im Zellkern binden die STAT-Dimere über ihre DNA-Bindungsregion an spezifische STAT-bindende-Elemente (SBE) oder auch γ -IFN aktivierte Sequenzen (GAS) der DNA. Das sind „TTCN_mGAA“-Motife der DNA, die in einer Vielzahl von Promotorregionen vorkommen (Heinrich et al., 1998; Ihle and Kerr, 1995). STAT 1, 3, 4, 5a und 5b binden an TTCN₃GAA Motife, STAT6 bindet an TTCN₄GGAA. (Horvath et al., 1995; Lew et al., 1991; Xu et al., 1996). Sie induzieren somit die Transkription der Zielgene. Die Primärstruktur der STAT-DNA-Bindungsregion ähnelt keiner anderen bisher bekannten DNA-Region und ist damit ausschlaggebend für die richtige Bindung zwischen den verschiedenen STATs und den richtigen DNA-Bindungsstellen.

Wie die Transkription im Einzelnen reguliert wird, ist allerdings noch unklar. Eine mögliche Komponente könnte die Serinphosphorylierung des konservierten Serinrestes der TAD sein (Decker and Kovarik, 2000; Kovarik et al., 2001; Wen et al., 1995). Einige Veröffentlichungen implizieren auch eine Beteiligung von MAP-Kinasen, speziell Erk's und p38MAPK, an der Serinphosphorylierung (David et al., 1995; Ng and Cantrell, 1997; Pircher et al., 1999; Turkson et al., 1999). Horvath et al. konnten 2000 zeigen, dass noch weitere Transkriptionsfaktoren einschließlich CBP/p300, c-Jun, MCM5 und BRCA1 an die TAD binden. Allerdings scheint auch die Coiled-coil-Domäne so wie die STAT-linker-Domäne mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren zu kooperieren (Abb. 7) und damit einen Einfluss auf die Transkriptionssteuerung zu nehmen (Imada and Leonard, 2000).

Es soll an murinen Nebennierenrindenzellen untersucht werden, ob Interleukin-11 und 6 eine Tyrosinphosphorylierung der TAD-Region von STAT1 am Tyrosinrest 701 und von STAT3 am Tyrosinrest 705 bewirken.

Schematischer Aufbau der STATs

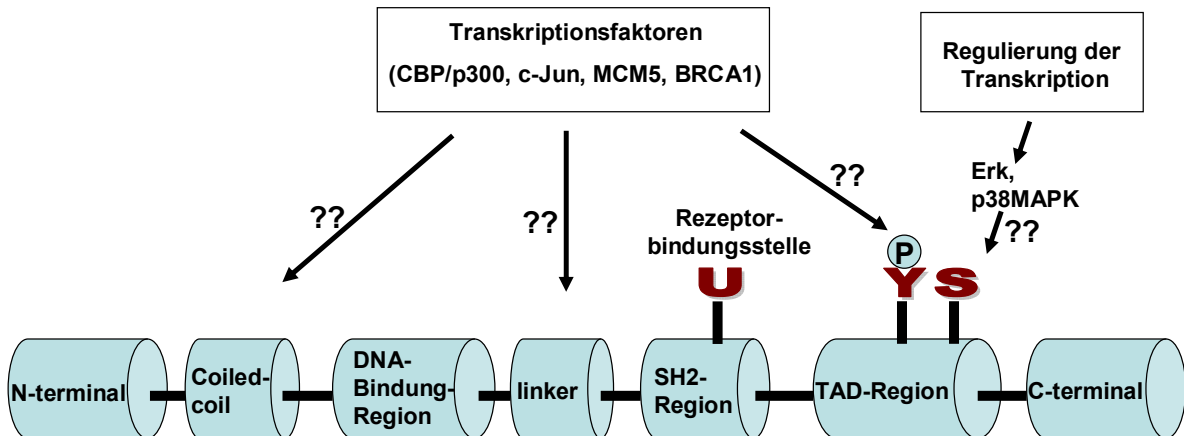


Abb. 7: STATs sind „Signal Transducers and Activators of Transcription“, also Proteine, die an der Signaltransduktion maßgeblich beteiligt sind. Bisher sind sieben verschiedene STATs bekannt. Hier ist ihr bisher bekannter Aufbau schematisch wiedergegeben. Die SH2-Domäne variiert nur gering unter den verschiedenen STATs und ist für die Bindung an den Rezeptor verantwortlich. In der TAD-Region befinden sich ein Tyrosin- und Serinrest, die phosphoryliert werden und damit zu einer Aktivierung der STATs führen. Die aktivierten STATs binden sich zu Homo- bzw. Heterodimeren. Diese Bindung erfolgt über phosphorylierte Tyrosin-Reste der TAD-Region und der SH2-Bindungsstelle. Zudem scheint die Coiled-coil-Region mitverantwortlich für die Dimerisation zu sein. Über die DNA-Bindungsregion erfolgt die Ankopplung der STAT-Dimere an die entsprechenden DNA-Promotor-Sequenzen wie z.B. an die SBE oder GAS-Regionen der DNA. Diskutiert wird eine Regulierung der Transkription durch verschiedene Transkriptionsfaktoren. (Eigene Abbildung nach Heinrich et al., 2003)

1.6.4 Regulation der Jak-STAT-Kaskade

Die Regulierung der Jak-STAT-Kaskade erfolgt über ein negatives Feedback durch mindestens drei verschiedene Regulatormechanismen (Abb. 8).

Erstens: Ein Hemmmechanismus kann über Tyrosinphosphatasen erfolgen, die eine SH2-Domäne enthalten (SHP-1 und SHP-2). Sie unterbrechen die Signalkaskade, indem sie die Phosphorylierung von Jaks und STATs hemmen (Haque et al., 1998; Jiao et al., 1996; Kim et al., 1998; You et al., 1999). *Zweitens:* So genannte PIAS „Protein Inhibitor of Activated STAT“ blockieren die Jak-STAT-Signalkaskade, indem sie einen negativen Einfluss auf die

Bindungsaffinität zwischen STATs und DNA-Bindungsstellen nehmen (Cooney, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass PIAS1 spezifisch an aktiviertes STAT1 bindet und damit eine DNA-Bindung verhindert. *Drittens*: Eine neue Familie von Proteinen, die die Jak-STAT-Kaskade negativ regulieren, sind die SOCS „Suppressor Of Cytokine Signaling“-Proteine. Diese werden nachfolgend ausführlich beschrieben.

Hemmung der Jak-STAT-Kaskade

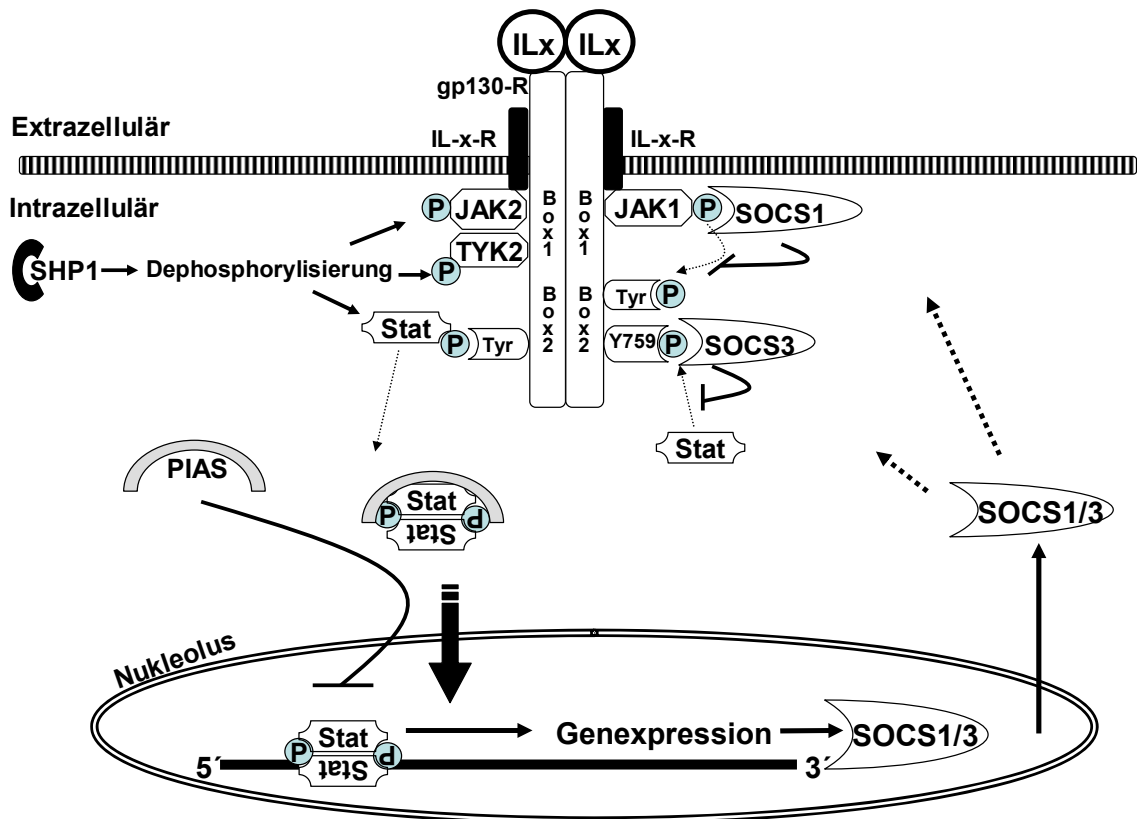


Abb. 8: Die Hemmung der Jak-STAT-Kaskade kann über verschiedene Mechanismen ablaufen. Die Hauptfunktion scheinen dabei die SOCS-Proteine zu spielen, die an die phosphorylierten Enden von JAK2 binden und dadurch deren autokatalytische Aktivität unterbinden. SOCS3 hemmt zudem direkt den signaltransduzierenden Rezeptor, indem es z.B. am gp130-Rezeptor den aktivierten Tyrosinrest Y759 blockiert und dadurch die STAT-Phosphorylierung verhindert. SOCS3 scheint außerdem STAT-Proteine durch Bindung direkt blockieren zu können. Letztendlich erfolgt eine Regulierung durch die STATs selbst, indem sie an STAT-binding-Sequenzen in der Promotorregion von SOCS-Genen assoziieren und dadurch eine negative Feedbackhemmung initiieren. Weitere inhibierende Faktoren sind die Tyrosinphosphatasen und die PIAS. Die Tyrosinphosphatasen (SHP-1/2) dephosphorylieren Jaks und STATs. Die PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) hemmen die Signalkaskade, indem sie eine Bindung der STATs an die DNA blockieren. (Eigene Abbildung)

1.7 SOCS: Suppressor of Cytokine Signaling

1.7.1 Klassifizierung der SOCS-Proteine

Die Familie der SOCS wurde erstmals von Starr et al. 1997 beschrieben.

Leider liegt bisher keine einheitliche Nomenklatur vor. Es gibt neben der Bezeichnung SOCS andere synonyme Bezeichnungen wie CIS „Cytokin-inducible SH2-Containing Protein“ (Masuhara et al., 1997; Yoshimura et al., 1995), SSI „STAT-induced STAT inhibitors“ (Minamoto et al., 1997; Naka et al., 1997) und JAB „Jak-binding protein“ (Endo et al., 1997). Bisher sind acht verschiedene Proteine der SOCS-Familie bekannt: CIS/CIS1 (Masuhara et al., 1997; Matsumoto et al., 1997; Yoshimura et al., 1995), SOCS1/JAB/SSI-1 (Endo et al., 1997; Naka et al., 1997; Ohya et al., 1997; Starr et al., 1997), SOCS2/CIS-2/SSI-2 (Masuhara et al., 1997; Minamoto et al., 1997; Starr et al., 1997), SOCS3/CIS3/SSI-3 (Masuhara et al., 1997; Minamoto et al., 1997; Starr et al., 1997) und SOCS4 bis SOCS7 (Hilton et al., 1998). Die hier verwendete Nomenklatur soll die der SOCS sein (SOCS1 – 7, CIS).

Die Proteine der SOCS-Familie zeichnen sich alle durch eine einheitliche Proteinstruktur aus (Abb. 9). Sie beinhaltet eine variable N-terminale Region, eine zentrale SH2-Domäne und ein konserviertes C-terminales Ende, auf dem das SOCS-Box-Motif liegt (Hilton et al., 1998). SOCS1 – SOCS3 und CIS enthalten ein relativ kurzes N-terminales Ende aus ca. 50-75 Aminosäuren, wohingegen SOCS4 – SOCS7 ein sehr langes N-terminales Ende mit mehreren hundert Aminosäuren besitzen (Cooney, 2002). Für eine suffiziente Hemmung der Jak-STAT-Kaskade ist die zentrale SH2-Domäne und die sog. prä-SH2-Domäne- bzw. Kinaseinhibierungs-Region (KIR) am N-terminalen Ende notwendig (Bousquet et al., 1999; Nicholson et al., 1999; Yasukawa et al., 1999). Über die SH2-Domäne binden SOCS an phosphorylierte Tyrosinreste der Jaks, STATs und direkt an den gp130-R. Sie bewirken damit eine Hemmung der Jak-STAT-Kaskade auf verschiedenen Ebenen. Die C-terminale SOCS-Box interagiert mit dem Elongin BC und vereitelt damit eine direkte Steuerung der eigenen Degradierung durch den ubiquitären Protease-Pathway (Auernhammer et al., 2000; Okabe et al., 1999; Zhang et al., 1999). Entsprechend konnte gezeigt werden, dass sich nach Zugabe von Proteaseinhibitoren die kurze Überlebenszeit der SOCS-Proteine von nur 60 bis 90 Minuten verlängern ließ (Bousquet et al., 1999; Kamura et al., 1998; Zhang et al., 1999). Die Funktion von SOCS1-3 und CIS ist bisher sehr gut erforscht, wohingegen die Wirkungsweise von SOCS4 -7 noch Gegenstand der jetzigen Forschung ist.

Schematische Darstellung von SOCS

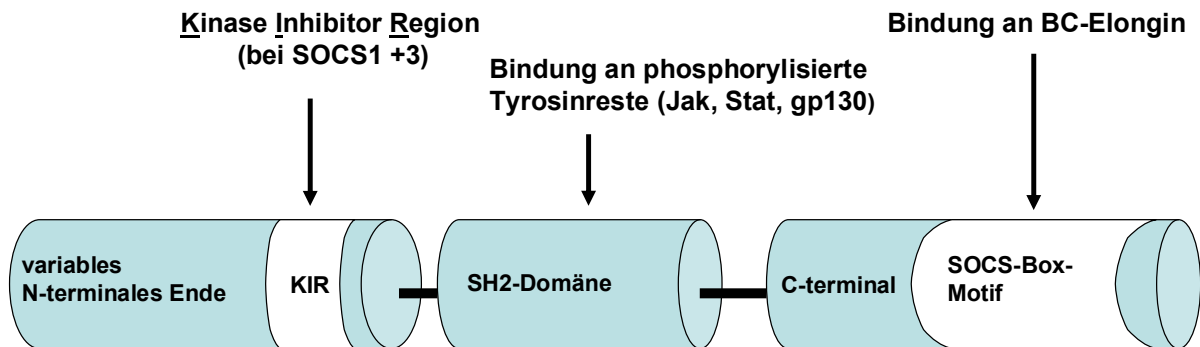


Abb. 9: SOCS sind „Suppressor Of Cytokine Signaling“, d.h. sie inhibieren eine Signalkaskade und beenden dadurch die zuvor durch die Signalkaskade induzierte Genexpression. Bisher sind acht verschiedene SOCS bekannt. In ihrer Proteinstruktur sind sie ähnlich aufgebaut. Über die zentrale SH2-Domäne binden SOCS an Jaks, STATs oder direkt an den gp130-Rezeptor und hemmen deren Funktion. Mitbeteiligt an der Hemmung scheint die Kinase-Inhibitor-Region (KIR) am N-terminalen Ende zu sein. Das SOCS-Box-Motif kommt auf jedem SOCS vor. Hier scheint das BC-Elongin zu binden und einen Schutz vor einer Proteolyse der SOCS zu bewirken. (Eigene Abbildung nach Heinrich et al., 2003)

1.7.2 Inhibierung der Jak-STAT-Kaskade durch SOCS

Vor allem SOCS1 und 3 verfügen über das bisher breiteste Wirkspektrum der SOCS-Familie. Beide Proteine binden an die JH1-Domäne von Jak2 und bewirken damit dessen Hemmung. SOCS1 inhibiert mindestens drei verschiedene Kinasen der Jak-Familie (Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2), indem es spezifisch an die aktivierten Tyrosinreste der Kinasen bindet (Hilton et al., 1998; Naka et al., 1997). SOCS1 bindet mit hoher Affinität über seine SH2-Domäne an die autophosphorylierte JH1-Domäne (Y1007) des Jak2 (Cooney, 2002; Yasukawa et al., 1999) und unterbindet dadurch dessen katalytische Aktivität (Endo et al., 1997; Naka et al., 1997). Weiterhin ist eine 28 AS kodierende Sequenz vor der SH2-Region am SOCS1 für die Inhibierung von Jak2 verantwortlich.

Der Hemmmechanismus von SOCS-3 scheint etwas komplexer zu sein. SOCS3 kann direkt verschiedene spezifische signaltransduzierende Rezeptoren an den Tyrosinresten blockieren, zudem kann es Januskinasen hemmen und damit eine indirekte Hemmung der Signalkaskade bewirken. Es wird sogar beschrieben, dass SOCS3 direkt an STAT-Proteine binden kann (Masuhara et al., 1997). Die Bindung an den gp130-Rezeptor erfolgt am phosphorylierten und damit aktivierten Tyrosinrest 759, der ebenfalls als eine SHP2-Bindungsstelle identifiziert worden ist (Nicholson et al., 2000). Die Bindung ist 1000fach stärker als die Bindung zu jeglichem anderen Mitglied der Jak-Kinase-Familie (Larsen and Ropke, 2002). Mutationsstudien am pTyr 759 des gp130-Rezeptors bestätigten die inhibitorische Wirkung des SOCS auf die Jak-STAT-Signalkaskade, denn eine Bindung von STAT1 sowie STAT3 war nicht mehr möglich (Nicholson et al., 2000; Schmitz et al., 2000).

Die Affinität von SOCS3 zu Jak2 scheint im Gegensatz zu SOCS1 niedrig zu sein und alleine zu keiner effektiven Hemmung des Jak-STAT-Pathways zu führen (Cooney, 2002).

Vor allem SOCS1 und SOCS3 scheinen von der Interleukin-6-Familie über STAT-Proteine induziert zu werden (Auernhammer et al., 2000; Auernhammer and Melmed, 2001). LIF bewirkt im Hypothalamus und in der Hypophyse eine SOCS3-Expression als Antwort auf Infektion und Inflammation (Auernhammer et al., 1998a). Interleukin-6 führt zu einer erhöhten Expression von SOCS1, 2 und 3 z.B. in Makrophagen und Fibroblasten (Nicholson et al., 1999; Starr et al., 1997). Für Interleukin-11 ist eine SOCS3-Aktivierung im Hypothalamus und der Hypophyse entdeckt worden (Auernhammer and Melmed, 1999).

In der murinen Nebennierenrinde soll nun nachgewiesen werden, dass Interleukin-11 und 6 eine Genexpression von SOCS3 induzieren.

1.7.3 Regulation der SOCS-Genexpression

Es konnte gezeigt werden, dass die SOCS-Genexpression u.a. durch STAT-Proteine reguliert wird. Das wurde deutlich, als man STAT-binding-Elements (SBE) in der Promotorregion von SOCS-Genen entdeckte (Starr et al., 1997). Die definitive Bindung von STAT-Proteinen an diese Regionen konnte durch Elektrophorese-Mobility-Shift Assays bewiesen werden (Emanuelli et al., 2000). Ein Umkehrbeweis der SOCS-Stimulation durch zytokininduzierte STATs konnte ebenfalls von Starr et al. erbracht werden, indem ein fehlender SOCS-mRNA-Anstieg verzeichnet werden konnte, nachdem eine STAT-Aktivierung durch mutierte Jaks in Zielzellen verhindert wurde (Starr et al., 1997).

1.8 Der Ras-MAP-Kinase Signalweg

Häufig wird von den Zytokinen der IL-6-Familie auch der Ras-MAP-Kinase Pathway zur Signaltransduktion benutzt, der allerdings zellspezifisch ist. Die SHP2 (SH2-domain-containing tyrosine phosphatase) bindet an tyrosinphosphorylierte Reste des zytoplasmatischen Anteils vom gp130-Rezeptor (Y 759) oder vom LIF-Rezeptor (Y 974) (Heinrich et al., 2003). Die JAK1-abhängige Phosphorylierung der SHP2 assoziiert den Grb2-SOS-Komplex an die SHP2. Das bewirkt eine Annäherung des Guanidin-Nukleotid-Austauscher „Son Of Sevenless“ SOS an die Zellmembran. Über SOS folgt eine GTP-abhängige Aktivierung der membrangebundenen Proteinkinase Ras. Die aktivierte Proteinkinase Ras induziert eine Aktivierung der Kinasen Raf und Mek (Wang et al., 1995; Yin and Yang, 1994). Die Ras-induzierte Signalkaskade endet letztendlich mit der Aktivierung der „Mitogen Activated Protein Kinasen“ (MAPK): Erk1/2, p38 und JNK. Die MAP-Kinasen gelangen in den Nukleolus und führen über Transkriptionsfaktoren zur Transkription von Zielgenen oder auch „Primary Response Genes“ (Abb. 10) (Arzt, 2001; Auernhammer and Melmed, 2000; Du and Williams, 1997; Gomez-Lechon, 1999).

Es soll untersucht werden, ob Interleukin-11 und 6 eine Aktivierung von ERK1 und 2 in stimulierten Nebennierenrindenzellen und damit die Induktion des Ras-MAP-Kinase Pathways induzieren.

Ras-MAP-Kinase-Pathway

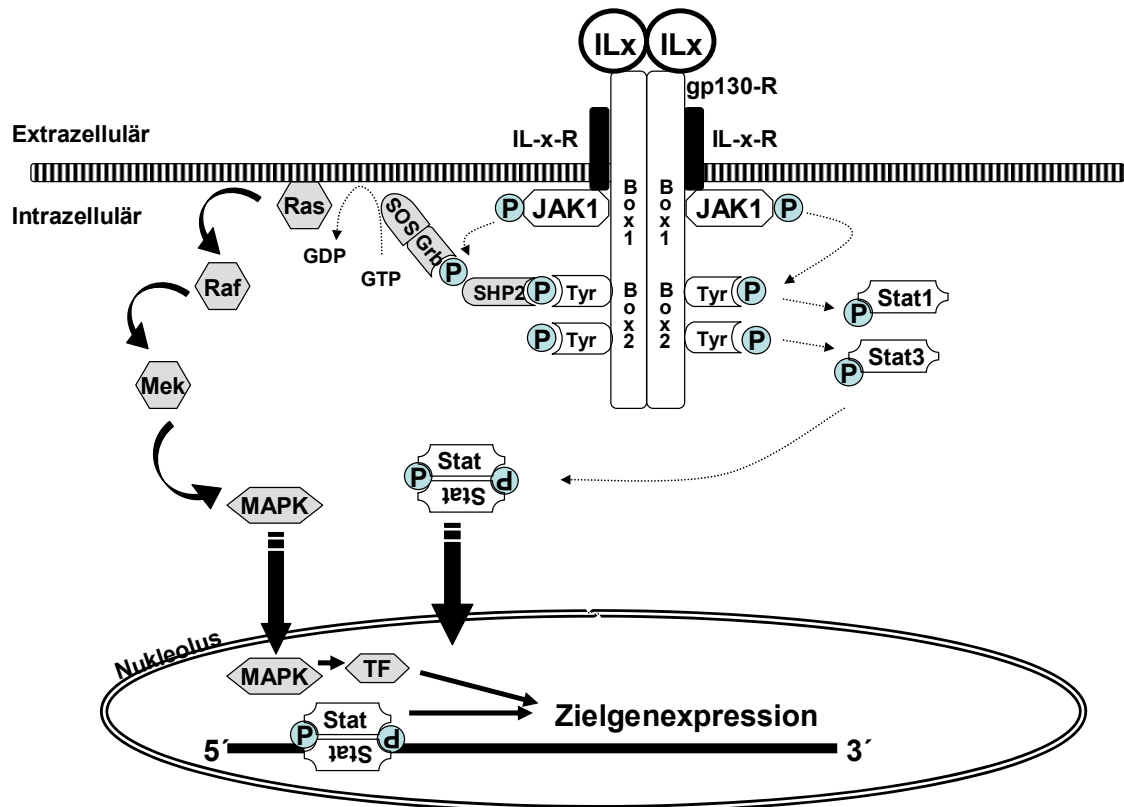


Abb. 10: Der zellspezifische Ras-MAPK-Pathway wird teilweise von den Zytokinen der IL6-Familie benutzt. Die Signaltransduktion findet ebenfalls über den gp-130-Rezeptorkomplex statt. Es binden SHP2 und Grb2 mit ihrer SH2-Domäne an tyrosinphosphorylierte Rezeptorenden. Der aktivierte Guanidin-Nukleotid-Austauscher „SOS“ induziert eine Aktivierung der membrangebundenen Ras und infolgedessen eine Aktivierung der Kinasen Raf, Mek und MAP (Erk1/2, p38 und JNK). Die MAP-Kinasen führen über Transkriptionsfaktoren zur Transkription der Zielgene im Zellkern. (Eigene Abbildung)

1.9 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-(HHN)- Achse

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse ist ein wichtiges System im lebenden Organismus, das für die Erhaltung des körpereigenen Gleichgewichtes während Stress, Infektionen oder andere inflammatorischer Geschehen zuständig ist. Es arbeitet mit hormonalen, immunregulatorischen und neuroendokrinen Faktoren. Zu ihnen gehören die üblichen Hormone wie ACTH und Cortisol. Diese unterliegen einer kontinuierlichen zirkadianen Ausschüttung. Es kann jedoch durch einen Stressfaktor wie z.B. eine Infektion zu einer zusätzlichen Stimulierung der HHN-Achse kommen. Im Hypothalamus wird CRH ausgeschüttet, das in der Hypophyse die Bildung und Sekretion von ACTH bewirkt. ACTH wiederum regt die Steroidbildung in der Nebennierenrinde an. Alle Hormone der HHN-Achse

bewirken ihrerseits eine Feedbackhemmung der übergeordneten Ebenen. Die Steroide induzieren eine körpereigene Bekämpfung des initialen Stressfaktors (Abb. 11).

Die Zytokine der Interleukin-6-Familie sind auch als Regulatoren der HHN-Achse bekannt. Sie wirken schon in der Neonatalperiode entwicklungsfördernd und stimulierend auf die HHN-Achse ein (Chesnokova and Melmed, 2002). Später sind die Interleukine der gp130-Rezeptor-Familie unentbehrliche Stimulatoren und Inhibitoren bei der Immunantwort der HHN-Achse auf eine Störung des Gleichgewichts im Organismus während Stress, Infektionen oder Inflammationen (Bornstein et al., 2004; Gerez et al., 2007; Judd et al., 2000; Path et al., 2000).

Die Interleukine der IL-6-Familie werden in peripheren Geweben, in Blutzellen und zentral im Hypothalamus und in der Hypophyse produziert (Besedovsky and del Rey, 1996). Sie wirken synergistisch mit den Hormonen auf allen Ebenen der HHN-Achse (Abb. 11). Beide Systeme regulieren sich durch eine Feedbackhemmung entweder über das produzierte Steroid oder über SOCS als Endprodukt.

Die Zytokine IL-6 und LIF der Interleukin-6-Familie haben eine immunmodulatorische Wirkung auf die HHN-Achse, indem sie die POMC-Genexpression und ACTH-Bildung an der Hypophyse induzieren (Auernhammer and Melmed, 2000; Bethin et al., 2000). Interleukin-6 fördert eine kontinuierliche CRH-Ausschüttung zur Aufrechterhaltung von inflammatorischen Geschehen (Vallieres and Rivest, 1999). LIF bewirkt ebenfalls eine Aufrechterhaltung der immunologischen Antwort der HHN-Achse während inflammatorischer Stresssituationen oder auch im septischen Schock (Auernhammer et al., 1998b; Chesnokova and Melmed, 2000; Wang et al., 1996).

Für Interleukin-6 ist ein die Steroidsynthese induzierender Effekt mit Stimulation der Cortisol- und Corticosteronproduktion an bovinen Nebennierenrindenzellen (Michl et al., 2000), an Nebennierenrindenzellen von Ratten (Franchimont et al., 2000) und im menschlichen Organismus (Mastorakos et al., 1993) bekannt. IL-6 und sein spezifischer Rezeptor werden im Hypothalamus, der Hypophyse und der Nebennierenrinde exprimiert (Shimon et al., 1997; Weber et al., 1997). Zusammenfassend stimuliert Interleukin-6 somit die Stresshormonsynthese der Nebennierenrinde sowohl indirekt über Stimulation der CRH-ACTH-Ausschüttung in Hypothalamus und Hypophyse als auch direkt durch Steuerung der Steroidsynthese der NNR.

Für Interleukin-11 wurde gezeigt, dass im Hypothalamus und an der Hypophyse eine IL-11-Genexpression erfolgt und in diesen Geweben auch IL-11-Rezeptoren vorliegen. Sie wurden ebenso in murinen corticotropen AtT-20-Zellen nachgewiesen. IL-11 bewirkt dort eine

POMC- und ACTH-Expression und scheint somit ebenfalls ein Stimulator der HHN-Achse zu sein (Auernhammer and Melmed, 1999). Allerdings wurde bislang noch kein Nachweis einer Funktion von Interleukin-11 an der Nebennierenrinde erbracht.

Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

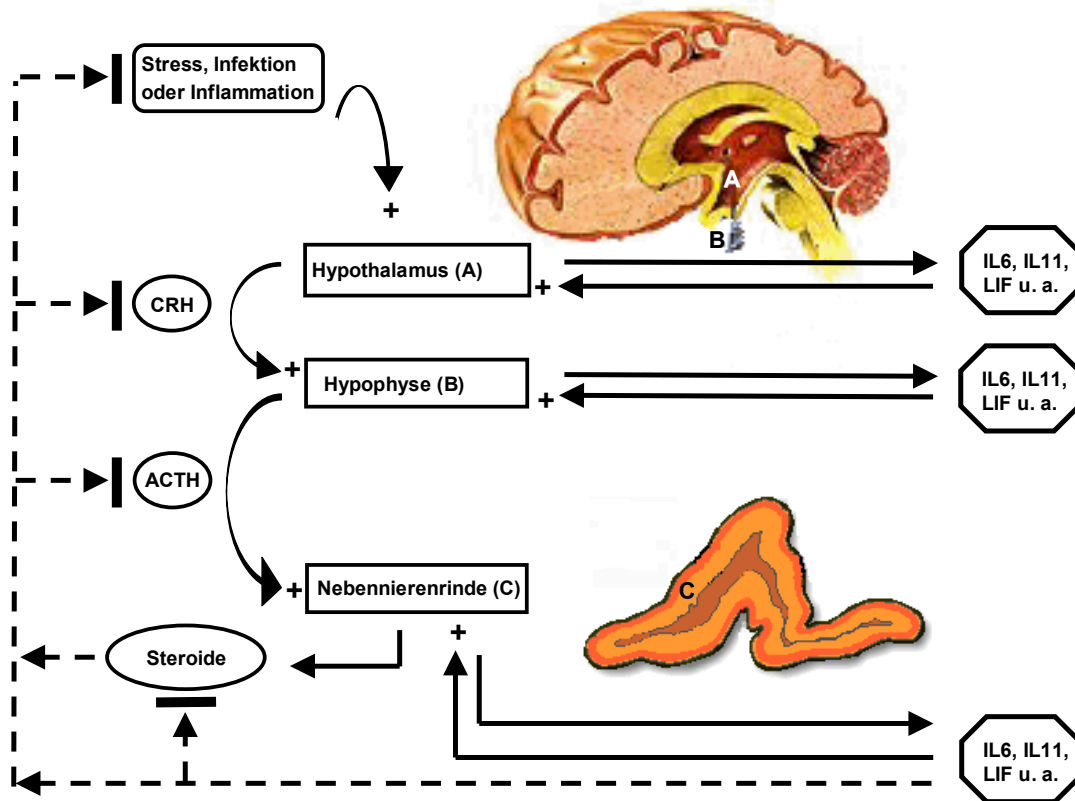


Abb. 11: Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse wird sowohl durch Hormone (CRH, ACTH und Cortisol) aktiviert, die in einer zirkadianen Rhythmik ausgeschüttet werden, als auch durch Interleukine, speziell die der Interleukin-6-Familie. In einer Stress-Situation wird vom Hypothalamus Corticotropes Releasing Hormon (CRH) ausgeschüttet, das an der Hypophyse eine Freisetzung von adrenokortikotropem Hormon (ACTH) bewirkt. ACTH induziert eine Freisetzung von Glukokortikoiden aus den adrenokortikalen Zellen der Nebennierenrinde. Zudem interagieren Interleukine auf allen drei Ebenen der HHN-Achse. (Eigene Abbildung)

1.10 Fragestellung und Zielsetzung

Die Zytokine der Interleukin-6-Familie sind bekannte Immunregulatoren der HHN-Achse.

Für Interleukin-6 ist zum einen eine indirekte Wirkung auf die Stresshormonsynthese der Nebennierenrinde über Aktivierung durch CRH-ACTH aus Hypothalamus/Hypophyse bekannt. Zum anderen wirkt Interleukin 6 direkt auf die Nebennierenrinde mit Induktion der Steroidbildung. (Mastorakos et al., 1993; Muramami et al., 1993). Für IL-11 ist bis jetzt eine stimulierende Wirkung auf die POMC-Genexpression und die ACTH-Sekretion an der Hypophyse bekannt (Auernhammer and Melmed, 1999). Nicht untersucht ist bisher, ob Interleukin-11 auch eine direkte Funktion an der Nebennierenrinde besitzt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die direkten Effekte von Interleukin-11 an der Nebennierenrinde zu untersuchen. Des Weiteren soll der Mechanismus der intrazellulären Signaltransduktion und -regulation untersucht werden.

Um den postulierten Einfluss von IL-11 an der Nebennierenrinde näher zu untersuchen, soll in vitro im Zellkultursystem von murinen Y-1 Nebennierenrindenzellen untersucht werden,

1. ob der für die Interleukin-6-Familie spezifische gp130-Rezeptor und der spezifische IL-11-Rezeptor an der Oberfläche der murinen Nebennierenrindenzellen exprimiert wird.
2. Falls diese Rezeptoren nachweisbar sind, stellt sich die Frage, ob Interleukin-11 an der murinen Nebennierenrindenzelle direkt wirkt. Bezug nehmend auf die bekannten Effekte von Interleukin-6 soll im Vergleich die Produktion von Steroidhormonen durch Stimulation mit Interleukin-6 bzw. -11 in einem Zellkultursystem mit den murinen Tumor-NNR-Zellen Y-1 nachgewiesen werden.
3. Der für die gp130-Zytokine bekannte Signalweg über die Jak-STAT-Kaskade soll ebenfalls in diesem Zellkultursystem für das Interleukin-11 untersucht werden. Interessant ist hierbei die Fragestellung, welche STAT-Moleküle durch Interleukin-11 aktiviert werden. Weiterhin stellt sich die Frage, ob IL-11 in Nebennierenrindenzellen den ubiquitären Signalweg über die Ras-MAP-Kinase benutzt.
4. Ebenso soll die negative Feedbackhemmung durch SOCS, speziell durch SOCS3, bewiesen werden. Dazu soll ein Anstieg von aktiviertem SOCS3 in den Nebennierenrindenzellen nach Interleukin-11-Stimulation nachgewiesen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

Substanzen

Y-1 Zellen, muriner Nebennierenrindentumor (American Type Culture Collection, CLL-79)

Hams F10 Medium (Gibco BRL)

Fetales Kälber Serum (Biochrom)

Pferdeserum (Biochrom)

Amphotericin B (Biochrom KG)

Penicillin / Streptomycin (Gibco BRL)

L-Glutamin (Seromed Biochrom KG)

BSA (Fa. Carl Roth)

BSA low endotoxin (Sigma)

Phosphate Buffer Saline (PBS: 270 mM NaCl, 13 mM Na₂HPO₄-2H₂O, 5 mM KCl, 2 mM K₂HPO₄, Apotheke GH)

PBS gereinigt (Biochrom KG)

ACTH-Synacthen (0,25 mg/ml, Ciba)

Trypsin (Seromed Biochrom KG)

DMSO (Sigma)

G-418 (Gibco-BRL)

Material

Gewebekulturflaschen, 75 cm² und 175 cm² (Falkon, Becton Dickinson)

Gewebekulturplatten Ø100 mm und Ø60 mm (Falkon, Becton Dickinson)

Multiloch-Gewebekulturplatten, 6-Loch (Falkon, Becton Dickinson)

Zellschaber (Sigma)

Millipore-Filter 0,22 µm (Millipore)

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

Geräte

Präzisionspipetten (Eppendorf)

Multipipetten (Eppendorf)
Glas-Pipetten (Eppendorf)
Pasteurpipetten (Eppendorf)
Pipettboy (Falcon, Becton Dickinson)
Neubauer-Zählkammer
Sicherheitswerkbank Typ LaminAir (Heraeus instruments)
Brutschrank Typ CO2-AutoZero (Heraeus instruments)
Tischzentrifuge (Hettich Rotanta/S)
Vortex, Leuko Instrumenten (Harb am Neckar)
Mikroskop (Zeiss West Germany)

Interleukine

h IL-6 (Sandoz AG, Nürnberg)
rm IL-11 (R&D Systems, Minneapolis, MN)

2.1.2 RT-PCR

RNA-Extraktion

Trizol-Reagenz (Gibco BRL Life Technologies)
Isopropanol (Sigma)
Chloroform zur Analyse (Merck)
Ethanol 75 % zur Analyse (Merck)
0,1 % DEPC-H₂O (Sigma)
Agarose (Sigma)
DNAse-freie 100µl-Gefäße (Eppendorf)
Microzentrifuge MC13 (Millipore)
Vortex (Leuco instrumenten M/J.N.V)
Photometer Untrospec Plus (Pharmarcia Biosystems)

RT-PCR

Strand-Puffer (Gibco BRL Life Technologies)
0,1 M DTT (Gibco BRL Life Technologies)
dNTP's (Gibco BRL Life Technologies)
Random-Primer (Gibco BRL Life Technologies)
RNAsin (Promega)

M-MLV Reverse Transkriptase (Gibco BRL Life Technologies)

DMSO (Sigma)

AmpliTaq-DNA-Polymerase (Perkin Elmer)

Primer: Sense, Antisense (Fa. Carl Roth GmbH)

DNA-Marker (Amersham)

Agarose (Gibco BRL Life Technologies)

Tris (Fa. Carl Roth GmbH)

Bohrsäure (ICN Biomedicals Inc.)

EDTA (Merck)

Mini-Prep (Quiagen)

Elektrophoresekammer Agargel Mini (Biometra)

Thermocycler Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer)

UV-Tisch 312 nm (Intas)

Video Graphic Printer UP890CE (Intas)

Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen, Cat. Nr.: 20021)

TBE-Puffer: 45 mM Tris, 45 mM Bohrsäure, 2 mM EDTA

Restriktionsenzyme

Apa I (10 U/ μ l, Buffer B+, Fermentas)

Sac I (10 U/ μ l, Buffer B+, Fermentas)

Xho I (10 U/ μ l, Buffer R+, Fermentas)

Nco I (10 U/ μ l, Buffer Y+/Tango, Fermentas)

2.1.3 Radioimmuno-Assay

Substanzen

Corticosteron (Fa. Merck)

BSA (Sigma)

Corticosteron-Tracer (Fa. ICN Biomedicals, RL102121)

Kaninchen-Anti-Corticosteron-Antikörper (Fa. ICN Biomedicals, RL120116)

Kaninchen-Gammaglobulin (Serva, Cat. No.22540, Heidelberg)

Schaf-Anti-Kaninchen-Gammaglobulin (Fa. Paesel, Cat. No. 14-102-00016)

Phenolrot (Merck)

Polyetylenglycol 6000 (Serva)

Geräte

Zentrifuge Hettich, Roto Silenta K (Hettich AG)

Bohrloch-Szintillationszähler Typ γ -Counter (Pharmacia GmbH)

Software Ria-Calc (Pharmacia GmbH)

Polystyrolröhrchen 3,5 ml (Sarstedt)

Lösungen

PBS (Phosphate Buffer Saline): 270 mM NaCl, 13 mM Na₂HPO₄-2H₂O, 5 mM KCl, 2 mM K₂HPO₄

Inkubationspuffer: 1000 ml PBS + 1 g BSA + 0,1 g NaN₃, pH 7,0 (1 % BSA, 1,5 mM NaN₃)

6 % Polyethylenglycol (PEG): 60 g PEG 6000 auffüllen mit PBS (pH 7,0) auf 1000 ml

1. Antikörperlösung: 20 ml Inkubationspuffer, 100 μ l Kaninchen-Anti-Corticosteron-AK (1. AK, 1:200), 20 μ l Kaninchen-Gammaglobulin-Ausgangslösung (7 μ g/ml), 200 μ l Phenolrot

Präzipitierungslösung: 80 ml 6 %iger Polyethylenglycollösung (1000 ml PBS, 60 mg Polyethylenglycol 6000), 100 μ l Schaf-Antikaninchen-Gammaglobulin (2. AK, 1:800)

2.1.4 Western Blot

Substanzen

Hepes (Boehringer Mannheim GmbH)

Natriumchlorid (Merck)

EDTA [Tripex III] (Merck)

Natriumpyrophosphat [Na₄P₂O₇] (Sigma)

Natriumfluorid [NaF] (Sigma)

Sodium Orthovanadate (Sigma)

Proteaseinhibitoren

Triton X 100 (Serva, Heidelberg)

PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) (Sigma)

Aprotinin (Sigma)

Leupeptin (Sigma)

Western Blot

DDT (Sigma)

SDS (Merck)
Tween 20 (Sigma)
Elektrophorese-Kammer MiniProtean (Biorad)
Immobilon-PVDF-Folie (Millipore)
Filterpapier Whatman 3CHR und 1CHR (Biometra)
Tris (Sigma)
Methanol (Sigma)
6-Aminohexansäure (Sigma)
Semidry - Graphit – Elektroden (Laborwerkstätten Klinikum Großhadern)
Anti-P-STAT3-AK, (Y704) monoklonaler Maus-AK (Upstate Biotechnology)
Anti-P-STAT1-AK, (Y701) polyklonaler Kaninchen-AK (Upstate Biotechnology)
Anti-P-STAT5-AK, (Y694) polyklonaler Kaninchen-AK (New England Biolabs)
Anti-P-p44/42MAPK-AK, (T202, Y204) polyklonaler Kaninchen-AK (New England Biolabs)
Anti-STAT3-Antikörper, polyklonaler Kaninchen-AK (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-STAT1-Antikörper; polyklonaler Kaninchen-AK (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-STAT5-Antikörper, polyklonaler Kaninchen-AK (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-MAPK-Antikörper, monoklonaler Kaninchen-AK (Upstate Biotechnology)
Ziegen-Anti-Maus-POD-Antikörper (Pierce Amersham)
Esel-Anti-Kaninchen-POD-Antikörper (Pierce Amersham)
SuperSensitiveWestDura Chemolumineszenz (Pierce Amersham)
Essigsäure (Apotheke Klinikum Großhadern)
Urea (Sigma)
XOMAT-Autoradiographiefilm, Biomax MR (Kodak)

Lösungen

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

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

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

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

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

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

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

Waschlösung II: 10 % Essigsäure, destilliertes Wasser

2.1.5 Luciferase-Assay

Substanzen

Superfect Transfection Reagent (Qiagen GmbH)

BSA-Low Endotoxin (Sigma)

Tris [C₄H₁₁NO₃](Carl Roth GmbH)

Glycerol (Merck)

Magnesiumchlorid (Merck)

Triton X 100 (Serva, Heidelberg)

EDTA [Triplex III] (Merck)

ATP (Amersham Pharmacia Biotech)

Luciferin (Sigma)

Geräte

Luminometer Lumat LB 9507 (EG&G Berthold)

Messröhrchen (Falcon, Becton Dickinson)

Lösungen

Lysis-Puffer: 25 mM Tris (pH 7,8), 15 % Glycerol, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA,
1 % Triton X 100

Messpuffer: 66 % Lysispuffer, 0,8 mM ATP, 0,3 mM D-Luciferin, destilliertes Wasser

2.1.6 Northern Blot

Nylon Membran (Hypobond-N+, Biotech, Cat. Nr.: RPN203B)

Whatman M3 Paper (Biometra)

Quick draw Paper (Sigma P-8549)

UV-Stratalinker 1800 (Stratagene)

QuikHyp (Stratagene, Cat. Nr.: 201220)

Salomon Sperm DNA (Stratagene, Cat. Nr.: 201190-81)

Kodak BIOMAX MS1 Radiographiefilm (Sigma Cat. Nr.: Z 36,300-6)

Beta-Aktin-Mouse (DECA Template, Ambion, Cat. Nr.: 7323)

DECAprimeTM II (Random Priming DNA Labeling Kit, Ambion, Cat. Nr.: 1455)

Deionisiertes Formamid (Gibco)

Formaldehyd (Sigma)
MOPS (Sigma)
Ethidiumbromid (Sigma)
Bromphenolblue (Sigma B-7021)
Xylene Cyanole FF (Sigma X-0377)
Glycerol (Sigma G-7757)
SSC = sodium-citrat-trisodium salt (Sigma)
SDS = lauryl sulfate (Sigma)

Lösungen

Sample-buffer: 60 % deionisiertes Formamid, 30 % Formaldehyd, 9 % 10 x MOPS, 0,1 % Ethidiumbromid

Loading buffer: 4 mM Bromphenolblue, 5 mM Xylene Cyanole FF, 30 % Glycerol in DEPC-H₂O

Hydrolysispuffer: 50 mM NaOH, 10 mM NaCl mit destilliertem Wasser auf 500 ml

Neutralisations Puffer: 90 % 20 x SSC, 0,2 M Tris (pH 7,4)

20 x SSC Stocklösung: 0,3 M sodium-citrat-trisodium salt, 3 M NaCl, pH 7,0

20 % SDS Stocklösung: 0,7 M SDS in destilliertem Wasser

2.1.7 Stabile Calcium-Phosphat-Transfektion

Vektoren

pCR3.1-Vektor mit CMV-Promotor (Fa. Invitrogen)

pCR3.1-Vektor mit CMV-Promotor und der gesamten SOCS3-cDNA (Auernhammer et al., 1998a)

Lösungen

0,1 x TE-Puffer (pH 8,0): 10 mM Tris-Puffer, 1mM EDTA auf 100 ml Millipore Wasser, pH-Abgleichen mit 1M HCl auf pH 8,0. Steril filtrieren mit 0,22 Micron-Filter

2x HEPES-Puffer: 280 nM NaCl, 10 nM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 12 mM Dextrose, 50 mM HEPES auf 100 ml destiliertes Wasser und pH 7,05. Steril filtrieren mit 0,22 Micron-Filter.

2M CaCl₂: 5,888 g CaCl₂·2H₂O in 20 ml destiliertem Wasser lösen und durch einen 0,22 Micron-Filter filtrieren.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Y-1 Zellen einer Zelllinie von einem Nebennierenrindentumor der Maus wurden von der American Type Culture Collection bezogen. Laut Beschreibung der ATCC konnte bei diesem Zellklon, der 1964 von Y. Yasumura et al. aus einem Nebennierenrindentumor einer männlichen LAF1-Maus gezüchtet worden ist, eine Steroidsekretion (4-Delta-3-Keto-Steroide) von durchschnittlich 4 µg/mg Zellprotein/h erhalten werden. Die Steroidsekretion wird am stärksten durch ACTH stimuliert und bleibt über 15 - 20 Passagen nach dem Auftauen erhalten. Bei Passage 51 liegt der Steroidlevel nur noch bei durchschnittlich 723 ng/mg Zellprotein/h und ist durch ACTH nicht mehr signifikant stimulierbar.

Nach der Arbeit von W.E. Rainey (2004) stammen die Y-1 Zellen aus der Zona fasciculata eines NNR-Tumors der Maus. Sie sind ACTH-sensibel und können Steroide aus exogenem oder *denovo* aus Glucose und Acetat produziertem Cholesterol bilden und sezernieren. Nach Stimulation mit ACTH produzieren Y-1 Zellen vor allem 20 α -Dihydroxy-Progesteron und 11 β ,20 α -Dihydroxy-Progesteron, zwei C21-Proteine, die sich in ihrer chemischen Strukturformel dem Corticosteron sehr ähneln. Normalerweise ist das Endprodukt von murinen Nebennierenrindenzellen der Zona fasciculata Corticosteron (Abb. 12). Wegen eines Gendefektes, der sich in dem Fehlen der 21-Hydroxylase CYP21 äußert, kann das sonst üblicherweise produzierte Corticosteron in Y-1 Zellen nicht hergestellt werden. Anstatt dessen wird aus Progesteron vor allem 20 α -Dihydroxy-Progesteron und 11 β ,20 α -Dihydroxy-Progesteron über die 20 α -Hydroxysteroiddehydrogenase (20 α -HSD) und die 11 β -Hydroxylase/p450c11 (CYP11B1) synthetisiert (Abb.12). Die CYP11B1 wäre auch die Hydroxylase, die Deoxycorticosteron in Corticosteron umwandeln würde. Dass Y-1-Zellen dazu befähigt sind, Corticosteron zu produzieren, konnte durch Transfektion von CYP21-Genen in Y-1 Zellen bewiesen werden (Rainey et al., 2004).

Steroidbiosynthese in der NNR Y-1 Tumorzelle

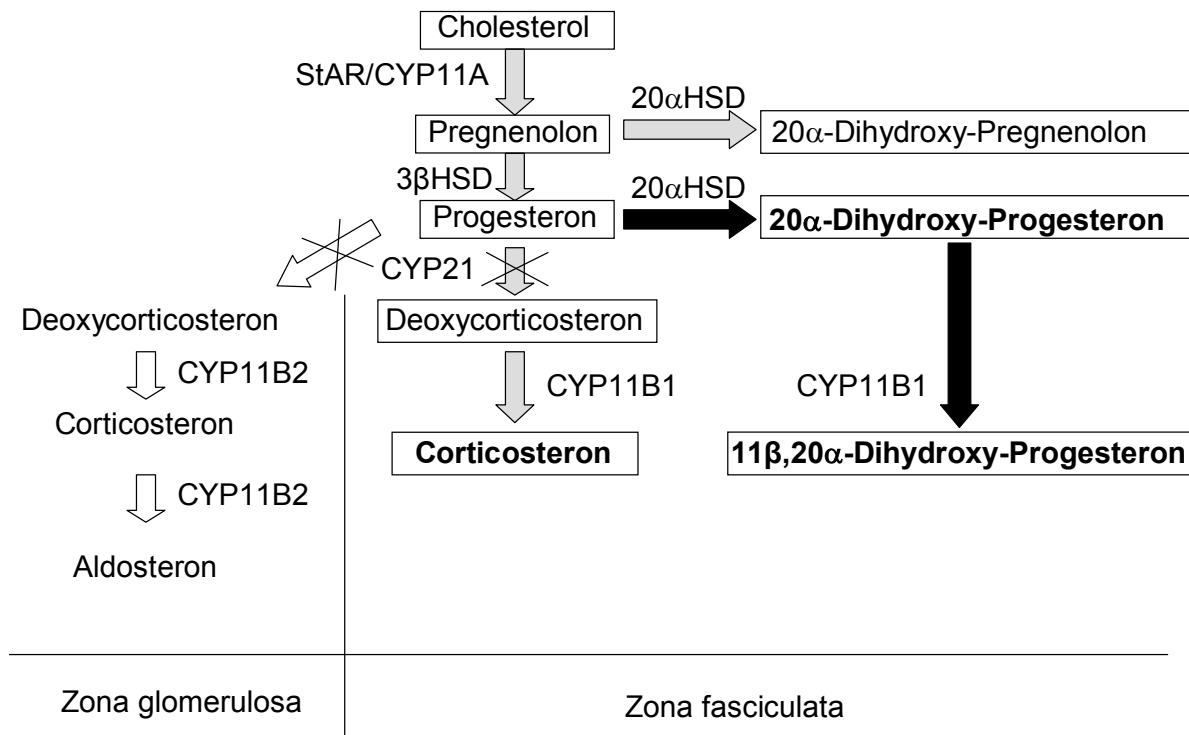


Abb. 12: Die Steroidsynthese in der Nebennierenrinde der Maus bzw. in Y-1 Zellen. In der Zona fasciculata wird normalerweise Corticosteron produziert. Da in den Y-1 Zellen jedoch ein Defekt der CYP21-Hydroxylase vorliegt, wird vornehmlich 20 α -Dihydroxy-Progesteron und 11 β ,20 α -Dihydroxy-Progesteron gebildet. Diese beiden Hormone ähneln sich in ihrer chemischen Strukturformel dem Corticosteron sehr stark. (Eigene Abbildung nach Rainey et al., 2004)

Die Y-1 Zellen wurden mit angereichertem Ham's F10 Medium kultiviert. Das angereicherte Hams F10 Medium enthielt 15 % Pferdeserum, 2,5 % fetales Kälberserum, 2 mM Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin sowie 0,4 % Amphotericin und wurde somit als Wachstumsmedium verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C und mit 5 % CO₂ inkubiert.

Im exponentiellen Wachstum begriffene Zellen wurden unter Verwendung von 1 %igem Trypsin neu passagiert oder für die entsprechenden Versuche ausgesät. Y-1 Zellen wurden mit 2 ml Wachstumsmedium in einer Dichte von 0,3 - 0,4 x 10⁶ Zellen pro Vertiefung in den 6-Loch-Gewebekulturplatten ausgesät. In 100 mm-Gewebekulturplatten wurden sie mit 8 ml Wachstumsmedium in einer Menge von 1,5 x 10⁶ Zellen kultiviert. So konnte zu Versuchsbeginn eine 50 % - 75 %ige Konfluenz, sowie eine 80 %ige Ausdifferenzierung der Zellen erreicht werden. Die Zelldichte wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

Wenn die Zellen ausdifferenziert und semikonfluent waren, war die Zellteilung minimiert, und der Zellorganismus konzentrierte sich auf die Steroidproduktion. Bei kompletter Zellkonfluenz war die Steroidproduktion reduziert. Aus diesem Grund wurde die Zellkultur 12 h vor Versuchsbeginn auf serumfreies Medium umgestellt. Somit konnte ein weiteres Zellwachstum gehemmt werden. Zudem konnte eine Stimulierung der Steroidproduktion durch Endo- und Exotoxine u.a. aus dem Pferde- und Kälberserum unterbunden werden.

Das serumfreie Medium bestand ausschließlich aus Ham's F10 mit 2 mM Glutamin und 0,1 % endotoxinfreiem BSA. Für den Radioimmuno-Assay wurde aus Kostengründen einfach steriles BSA verwendet. Dem serumfreien Medium wurden prophylaktisch Penicillin, Streptomycin und Amphotericin in o.g. Konzentrationen dazugegeben, da durch die häufigen Entnahmezeiten ein erhöhtes Infektionsrisiko bestand. Vor Stimulationsbeginn wurde erneut ein Mediumwechsel mit serumfreiem Medium durchgeführt und die Interleukine in einer Konzentration von 10 ng/ml (außer beim Dosisverlauf mit Interleukin-6 und 11, Radioimmuno-Assay) dazugegeben.

Um die transfizierten Zellen zu selektieren, wurde den jeweiligen Medien Neomycin G418 in einer Konzentration von 500 µg/ml dazugegeben.

2.2.2 RT-PCR

RNA-Extraktion

Die Y-1 Zellen wurden in Zellkulturgewebescheiden mit einem Durchmesser von 10 cm gezüchtet. Je nach Fragestellung wurde die RNA von unbehandelten Zellen oder von stimulierten Zellen extrahiert.

Für den Nachweis des IL-11-Rezeptors, des gp130-Rezeptors und des IL-11 in unbehandelten Y-1 Zellen wurde die RNA-Extraktion bei einer vollständigen Konfluenz der Zellen durchgeführt. So konnte eine möglichst große Ausbeute an RNA erzielt werden. Die Zellkultur wurde mit Wachstumsmedium unter den üblichen Bedingungen inkubiert und 12 h vor der RNA-Extraktion auf serumfreies Medium umgesetzt.

Für den Nachweis von SOCS3 in Y-1 Zellen durch Stimulation mit IL-11 und 6 wurde die RNA bei einer 80 %igen Zellkonfluenz extrahiert, denn die Zellen sollten durch die Interleukine noch stimulierbar sein. 12 h vor Versuchbeginn wurden die Zellen auf serumfreies Medium gesetzt. Das serumfreie Medium wurde vor der Zugabe der Interleukine nochmals gewechselt.

Zum Extraktionszeitpunkt wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und diese sofort mit jeweils 500 µl Trizol für 5 Minuten inkubiert. Die Trizol-Zellsuspension wurde mit einem

Zellschaber abgekratzt, so dass möglichst alle Zellen gelöst und lysiert werden konnten. Das Zelllysate wurde in je ein steriles Eppendorfcup pipettiert. Pro Eppendorfcup wurden 200 µl Chloroform dazupipettiert, geschüttelt und für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 12.000 rpm in der Ultrazentrifuge für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Die jeweils in der oberen wässrigen Phase enthaltene RNA wurde sehr vorsichtig ohne die DNA- und Proteinschicht aufzuwirbeln in ein neues steriles Eppendorfcup überführt. Pro Eppendorfcup wurden nun 500 µl Isopropanol dazupipettiert, kurz gevortext und ebenfalls 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Proben wurden erneut mit 12.000 rpm bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Danach konnte man ein weißes Pellet am Boden des Eppendorfcups ausfindig machen. Der Überstand wurde ohne Berührung des Pellets abpipettiert und verworfen. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml 75 % Ethanol bedeckt und mit 7.000 rpm bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Ethanol wurde abpipettiert und das geöffnete Eppendorfcup wurde so lange in einen Heizblock bei 60°C gestellt bis das Ethanol verdampft war. Das Pellet sollte dabei nicht austrocknen.

In dem Zustand wurde das RNA-Pellet je nach Größe mit 10-20 µl 0,1 % DEPC-H₂O aufgelöst und bei -80°C für mindestens 12 h eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die RNA nochmals kurzzeitig auf 68°C erhitzt. Sie wurde durch mehrmaliges Pipettieren gelöst. In einem Photometer bei 260 nm (für RNA und DNA) und bei 280 nm (für Proteine) wurde die RNA-Konzentration bestimmt. Der Reinheitsgrad wurde aus dem Quotienten [260nm]/[280nm] bestimmt und lag optimaler Weise bei 1,8 ± 0,2. Die bei 260 nm gemessene Extinktion wurde in die Absolutmenge an RNA umgerechnet. Die Absorption einer RNA-Lösung beträgt 0,04 µg/µl bei OD₂₆₀, folglich lautet die Berechnung:

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

Die RNA wurde nach dem Bearbeiten sofort wieder tiefgefroren.

RT: Reverse Transcription

Die Transkription der RNA zu cDNA wurde mit 1 µg reiner mRNA in 20 µl Reaktionsvolumen mit Hilfe einer reversen Transkriptase (RTase, Gibco BRL) durchgeführt. Pro 1 µg mRNA wurden 4 µl 10fach Puffer, 2 µl 0,1 M DTT, 0,4 µl dNTP's, 0,6 µl Random-Primer, 0,5 µl RNAsin und 1,2 µl RTase in 11,3 µl DEPC-H₂O benötigt. Das RNAsin und die RTase wurden dem Reaktionsvolumen als letzte Reagenzien hinzugefügt. Sie wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert, um eine Inaktivierung zu vermeiden. Um eine Verunreinigung der mRNA mit DNA auszuschließen ist bei jeder Reversen Transkription eine Negativkontrolle mitgelaufen. Der Negativkontrolle wurde anstelle der RTase DEPC-

H₂O hinzugefügt wurde. Falls die mRNA frei von DNA-Verunreinigungen gewesen war, konnte bei der darauf folgenden PCR keine DNA-Bande aufgedeckt werden, denn die *Taq*DNApolymerase konnte nur die DNA nicht aber die untranskribierte mRNA als Matrize ablesen.

Die reverse Transkription von mRNA in cDNA erfolgte in den o.g. 20 µl Reaktionslösung bei 37°C für 60 Minuten. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Proben über 7 Minuten auf 95°C erhitzt wurden. Die cDNA wurde bis zur Verwendung für die PCR bei -20°C gelagert.

PCR: Polymerase Chain Reaction

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) wurde mit jeweils 2 µl cDNA in 50 µl Reaktionsvolumen an einem GeneAmp PCR System 2400 durchgeführt. Das Reaktionsvolumen enthielt 10 % 10fach PCR-Puffer, 5 % DMSO, 0,2 mM dNTP's, 3 Units *Taq*DNApolymerase und je 20 pmol Sense- bzw. Antisense-Primer. Die PCR lief mit einem einmaligen Denaturierungsprozess bei 94°C für 3 Minuten gefolgt von 40 Amplifizierungszyklen. Ein Amplifizierungszyklus bestand aus einer Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden, der Primeranlagerung bei 58°C für 30 Sekunden und der Amplifizierung bei 72°C für 45 Sekunden. Die PCR wurde mit einem einmaligen Elongationsschritt bei 72°C für 10 Minuten abgeschlossen.

Für den Nachweis des IL-11-Rezeptors wurde o.g. Schema benutzt, der gp130-Rezeptor wurde mit dem gleichen Prinzip allerdings mit nur 38 Amplifizierungszyklen nachgewiesen.

Für die Aufdeckung des IL-11 war eine „Hot-Start-PCR“ notwendig. Für die „Hot-Start-PCR“ wurden erst nach dem einmaligen Denaturierungsprozess für 3 Minuten bei 94°C die Primer sowie die *Taq*DNApolymerase zu dem Reaktionsvolumen dazupipettiert. Im Folgenden liefen 40 gleich formierte Transkriptionszyklen ab, die jeweils aus der Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden, aus der Primeranlagerung bei 60°C für jeweils 60 Sekunden und der Amplifizierung bei 72°C für 45 Sekunden bestanden. Die Elongationsphase bei 72°C dauerte 10 Minuten. Das Reaktionsvolumen von insgesamt 50 µl stellte sich aus 2 µl cDNA, 10 % 10fach Puffer, 5 % DMSO, 0,2 mM dNTP's und 38,65 µl DEPC-H₂O zusammen. Die je 20 pmol Sense- bzw. Antisense-Primer und 3 Units *Taq*DNApolymerase wurden erst nach der dreiminütigen Aufheizphase auf 94°C dazupipettiert.

Das Prinzip der Hot-Start-PCR verhindert eine vorzeitige unspezifische Primeranlagerung, da manche Primer nur bei ihrer speziellen Annealingtemperatur an die spezifischen DNA-Sequenzen binden, bei niedrigeren Temperaturen jedoch auch unspezifische Sequenzen binden können.

Sowohl die cDNA der Reversen Transkription als auch die DNA der Polymerase Chain Reaction und die fragmentierte DNA wurden mittels Gelelektrophorese auf einem 1,2 %igen Agarosegel, das 0,17 % Ethidiumbromid enthielt, nach ihrer Menge an Basenpaaren aufgetrennt. Für das Agarosegel benötigte man 10 ml 10 x TBE-Puffer (27 g Tris, 13,8 g Bohrsäure, 20 ml 0,5 M EDTA in 100 ml Aqua dest.), 40 ml Aqua dest., 0,6 g Agarose und 30 µl Ethidiumbromid. Es wurden jeweils 10 µl der Proben (RT- bzw. PCR-Produkt) mit jeweils 3 µl loading buffer in die Geltaschen pipettiert. Für die Auftrennung der fragmentierten DNA wurden 20 µl verwendet und für die unfragmentierte DNA-Probe 15 µl mit jeweils 3 µl loading buffer. Bei jeder Gelelektrophorese lief ein 100 pb-Marker mit. Nach dem Einlauf der Proben bei 130 V für 15 Minuten, dauerte die Elektrophorese noch 30 Minuten bei einer Spannung von 110 V. Danach wurden die gesuchten Banden auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht und fotografiert.

Fragmentierung der PCR-Produkte mittels Restriktionsenzymen

Für die Fragmentierung der PCR-Produkte benötigte man eine große Menge des entsprechenden DNA-Segmentes. Dafür wurden 8 µl cDNA (RT-Produkt) nach den oben beschriebenen PCR-Protokollen in 200 µl Reaktionsvolumen amplifiziert. Die gesamten 200 µl wurden auf einem 1,2 %igen Agarose Gel aufgetragen. Die ersten 15 Minuten wurde eine Spannung von 130 V angelegt, für die folgenden 30 Minuten lag eine Spannung von 110 V vor. Neben den PCR-Produkten lief ein 100-bp-DNA-Marker mit. Durch den Gehalt von 0,17 % Ethidiumbromid im Agarosegel konnten die Banden auf dem UV-Tisch sichtbar gemacht werden. Sie wurden vorsichtig aus dem Gel ausgeschnitten, und die DNA aus dem Gel extrahiert. Die DNA lag nun frei vor und konnte mittels Restriktionsenzymen fragmentiert werden.

Die RNA für den IL-11-Rezeptor erstreckt sich über Exon 4 bis 9 und beinhaltet die Information sowohl für die alpha- als auch für die alpha2-Isoform des Rezeptors. Beide Isoformen wurden mit einem Primer-Paar (Basenpaar 304-891, GenBank Accession U14412) durch ein 588 bp großes cDNA-Fragment nachgewiesen. Das DNA-Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym *NcoI* in zwei Fragmente von 288bp und 300bp geschnitten. Dazu wurden 15 µl der extrahierten DNA mit 20 Units Restriktionsenzym *NcoI* und 3 % Reaktionspuffer über Nacht bei 37°C inkubiert.

Der transmurale gp130-Rezeptor wurde ebenfalls durch zwei spezifische Primer nachgewiesen. Die 459 bp umfassende cDNA konnte nach oben beschriebener Gelextraktion spezifisch mit *NcoI* in ein 298 bp und ein 161 bp großes Fragment geschnitten werden. Der Reaktionsansatz für die Restriktion war der gleiche wie für den IL-11-Rezeptor.

Nach der Gelextraktion der cDNA von murinem IL-11 konnte ein 565 bp langes Fragment nachgewiesen werden. Es wurde mit dem Restriktionsenzym *ApaI* (15 μ l cDNA, 20 Units *ApaI*, 3 % Reaktionspuffer bei 37°C über Nacht) in zwei Fragmente von 228 bp und 337 bp Länge geschnitten werden (bp 200-764, GenBank Accession U32324).

2.2.3 Messung der Steroidkonzentration mittels Radioimmuno-Assay

Zellkultur

Y-1 Zellen wurden in einer Konzentration von $0,35 \times 10^6$ Zellen pro Loch in einer 6-Loch-Gewebekulturplatte mit je 2 ml Wachstumsmedium kultiviert und 30 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach dieser Zeit waren die Zellen semikonfluent und mindestens 80 % differenziert. Sie wurden über Nacht auf serumfreies Medium umgesetzt. Nach der 12-stündigen Übernachtinkubation wurde ein erneuter Mediumwechsel durchgeführt. Mit einer Multipipette wurden 2 ml serumfreies Medium in je eine Vertiefung pipettiert. Anschließend wurden die Interleukine-6 bzw. 11 in der entsprechenden Konzentration (10 ng/ml im Zeitverlauf; 0,5 ng/ml – 50 ng/ml im Dosisverlauf), 10^{-7} M ACTH als Positivkontrolle und serumfreies Medium als Nullkontrolle zugegeben.

Die Inkubationszeit bei 37°C und 5 % CO₂ betrug bis zu 72 h. Jeweils nach 12 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h wurden 200 μ l des Überstandes abpipettiert und bei -20°C konserviert.

Radioimmuno-Assay

Die Messung der Steroidkonzentration im Zellkulturüberstand wurde mit einem Corticosteron-Radioimmuno-Assay der Firma ICN durchgeführt. Die Kreuzreaktivität des 1. Antikörpers betrug laut Fa. ICN für Corticosteron 100 %, für Desoxycorticosteron 0,34 %, für Testosteron 0,1 %, für Cortisol, Aldosteron und Androstendion jeweils 0,05 % bzw. 0,03 % und 0,02 %. Für die übrigen Steroidhormone wurde eine Kreuzreaktivität mit < 0,01 % angegeben.

Wie in 2.2.1. erläutert produzieren Y-1 Zellen kein Corticosteron, sondern Vorstufen wie 20α -Dihydroxy-Progesteron und $11\beta,20\alpha$ -Dihydroxy-Progesteron, die dem Corticosteron in ihrer chemischen Strukturformel sehr ähneln. Zudem ist durch die Bildung von $11\beta,20\alpha$ -Dihydroxy-Progesteron eine Aktivierung der CYP11B1-Hydroxylase indirekt nachgewiesen, die ebenso für die Umwandlung von Deoxycorticosteron in Corticosteron, dem eigentlichen Endprodukt der murinen NNR-Zelle, notwendig ist (Abb. 12). Generell konnte die Fähigkeit der Corticosteronproduktion durch Y-1 Zellen in einer Transfektionsstudie mit dem CYP21-

Gen nachgewiesen werden (Rainey et al., 2004). Somit wurden Steroidvorstufen zum Corticosteron nachgewiesen, die jedoch ebenfalls als Indikator für die Steroidsynthese verwendet werden konnten.

Es muss deshalb retrospektiv davon ausgegangen werden, dass der verwendete Radioimmuno-Assay nicht Corticosteron, sondern die o.g. dem Corticosteron sehr ähnlichen Steroidvorstufen detektiert, welche mit unseren Messungen nicht näher charakterisiert werden konnten. Wir benutzten den Assay somit zur Detektion von Steroidvorstufen bzw. als Maß der „Gesamtsteroidproduktion“.

Für die Standardkurve wurde eine geometrische Verdünnungsreihe mit genau definierten Mengen an unmarkiertem Corticosteron von 2,5 ng/ml bis 0,009 ng/ml (gelöst in 0,1 % BSA-PBS-Puffer mit 0,01 % NaN₃, pH 7,0) erstellt. Das Corticosteron der Fa. Merck wurde in einem Messkolben zu 1 mg/ml eingewogen und auf 10 ng/ml verdünnt. Da Corticosteron ein sehr stabiles Hormon ist, diente diese Einwaage als Ausgangslösung für alle Standardkurven. Die 1. Antikörperlösung wurde vor Versuchsbeginn hergestellt und mindestens 30 min. inkubiert. Die Präzipitierungslösung wurde mindestens 12 h inkubiert, um eine ausreichende PEG-AK-Komplexbildung zu garantieren.

Für den Versuchsansatz wurden jeweils 50 µl der Standardverdünnungen bzw. Zellkulturüberstände mit 50 µl Corticosteron-Tracer und 50 µl der 1. Antikörperlösung gemischt (Vortex) und für 12 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1 ml der Präzipitierungslösung dazugegeben, gemischt (Vortex) und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließendes Zentrifugieren bei einer Beschleunigung von 2000 g für 20 Minuten wurde das gebundene Corticosteron (sowohl radioaktivmarkiert als auch unmarkiert) von dem freien Hormon im Überstand getrennt. Der Überstand wurde durch Dekantieren verworfen. Der in den Röhrchen übrig gebliebene Niederschlag enthielt den Tracer sowie die zu bestimmende Menge an Corticosteron bzw. Steroiden.

Anhand der im Gamma-Counter gemessenen Radioaktivität konnte mittels der Standardkurve und der umgekehrten Proportionalität die Steroidmenge im Zellkulturüberstand ermittelt werden. Dazu wurde das Softwareprogramm Ria-Calc der Fa. Pharmacia verwendet.

Damit die zu messenden Werte der Zellkulturüberstände im linearen Bereich der Eichkurve lagen (0,075 ng/ml - 1,25 ng/ml), wurden Vorversuche mit gepoolten Zellkulturüberständen der jeweiligen Versuchsgruppe und Abnahmezeit durchgeführt. Die jeweilig notwendige Verdünnung wurde anhand der Eichkurve berechnet.

2.2.4 Western Blot

Zellkultur

Im exponentiellen Wachstum begriffene Y-1 Zellen wurden 48 h vor Versuchsbeginn lysiert. Sie wurden in einer Menge von $1,8 \times 10^6$ Zellen pro Gewebekulturschale (\varnothing 10 cm) ausgesät und mit 8 ml Wachstumsmedium bei 5 % CO₂ und 37°C inkubiert. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 48 h. Die Y-1 Zellen wurden mit 6 ml serumfreiem Medium (Hams F10, 0,1 % endotoxinfreies BSA) bei 75 %iger Zellkonfluenz und vollständiger Zelldifferenzierung behandelt. Nach 12 h Übernachtinkubation wurde ein erneuter Wechsel auf serumfreies Medium durchgeführt, um eventuelle Endotoxinüberstände zu entfernen.

Nach Stimulierung mit den Interleukinen-11 und -6 in einer Konzentration von 10 ng/ml für 2, 5, 10 und 15 Minuten wurde das Medium sofort abgesaugt. Es wurden 500 µl Lysispuffer pro Gewebekulturschale dazugegeben und sofort für 10 Minuten auf Eis gestellt. Der Lysispuffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Na₄P₂O₇, 100 mM NaF, 2 mM Natrium-orthovanadat, pH 7,4) enthielt 1 % Triton, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 2 µg/ml Aprotinin und 20 µM Leupeptin als Proteaseinhibitoren. Nach der Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension mit dem Zellschaber abgekratzt und in jeweils einem sterilen Eppendorfcup bei -20°C eingefroren.

Western Blot

Mittels dieser Methode sollte die Menge an phosphorylierten STAT-Proteinen bestimmt werden: pSTATx aus dem Zellkulturüberstand wurde auf eine Membran transferiert. Anti-pSTATx-Antikörper der Maus haben die auf die Membran transferierten pSTATx gebunden. Diese wurden von Peroxidase-markierten Anti-Maus-Antikörpern und Chemolumineszenz detektiert und auf einen Radiographiefilm abgelichtet. Anhand der Schwärzung des Films konnte die Menge an pSTATx nachgewiesen werden.

Das Zelllysate wurde aufgetaut und 20 Minuten mit einer Beschleunigung von 12.000 g bei 4°C zentrifugiert. Dadurch wurden überflüssige Zellbestandteile von den Proteinen abgetrennt. Der Überstand mit den Proteinen wurde mit dem Probenpuffer (0,1 % DDT, 1 % Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)) im Verhältnis 1:2 für 5 Minuten auf 95°C aufgeköcht. Jeweils 40 µl dieser Proteinsuspension wurden auf ein 10 %iges SDS Polyacrylamidgel aufgetragen. Die einzelnen Proben liefen ca. 1-2 h bei 30 mA pro Gel und wurden so nach dem SDS-PAGE System (Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese) ihrer Größe nach aufgetrennt. Mit einem 4 % Sammelgel und einem 8 % Trenngel fand eine Proteinauftrennung im Bereich von 10-150 kDa statt.

Die Proben wurden mit dem Semidry-Westernblot-Verfahren nach Kyhse-Andersen (J. Biochem. Biophys. Methods, 10 (1984) 203-209) von dem Gel auf die PVDF-Membran transferiert. Dafür musste die PVDF-Membran für das Elektroblothing in Methanol aktiviert und dann im Anode-II-Puffer äquilibriert werden.

Auf die PVDF-Membran wurden zwei Lagen in Anode-II-Puffer (0,025 M Tris und 20 % Methanol = 1,5 g Tris, 100 ml Methanol, 400 ml Aqua dest.) getränkte Whatman 3CHR-Paper und eine Lage in Anode-I-Puffer (0,3 M Tris und 20 % Methanol = 18,17 g Tris, 100 ml Methanol, 400 ml Aqua dest.) getränktes Whatman 3CHR-Paper gelegt und die Anode angeschlossen. Unter der PVDF-Membran lag das SDS-PAGE-Gel. Unter dem Gel befand sich eine Lage Whatman 1CHR-Paper, das im Kathoden-Puffer (6-Aminohexansäure-Puffer (0,04 M) mit 20 % Methanol und 0,01 % SDS = 2,6 g 6-Aminohexansäure, 100 ml Methanol, 400 ml Aqua dest., 0,05 g SDS) getränkt war, sowie 3 Lagen Whatman 3CHR-Paper, ebenfalls im Kathoden-Puffer getränkt. Hieran wurde die Kathode angeschlossen, so dass der Transfer der Proteine von dem SDS-PAGE-Gel auf die PVDF-Membran innerhalb einer Stunde bei 2 mA pro cm² Membranfläche stattfinden konnte.

Die Membran wurde nach dem Proteintransfer für eine 1 h in einem 1,5 % PBS-Tween-Puffer (0,1 M Phosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,5, 1,5 % Tween 20, im Folgenden PBS-T genannt) auf dem Schüttler bei Raumtemperatur geblockt.

Die Inkubation mit der 1. Antikörperlösung erfolgte in der jeweils passenden Verdünnung mit Anti-P-STAT3 (Maus-AK, 1:40.000), Anti-P-STAT1-AK (Kaninchen-AK, 1:10.000), Anti-P-STAT5-AK (Kaninchen-AK 1:5.000) und Anti-P-MAK-AK (Kaninchen-AK 1:40.000) in 1,5 % PBS-T. Die Membran wurde mit 0,5 ml/cm² bedeckt und 16 h über Nacht unter ständigem Schütteln inkubiert.

Nach zweimaligem Waschen mit 0,1 % PBS-Tween 20 wurde die Membran für 2 h mit dem Peroxidase-konjugierten 2. Antikörper behandelt. Für den Nachweis von pSTAT3 wurde ein polyklonaler POD-konjugierter Ziegen-Anti-Maus-AK verwendet. Der Nachweis von pSTAT1, pSTAT5 und pMAPK wurde mit einem polyklonalen POD-konjugierten Esel-Anti-Kaninchen-AK durchgeführt. Die 2. AK-Lösung wurde in einer Verdünnung von 1:25.000 in 2 % PBS-Tween 20 verwendet und in einer Menge von 0,5 ml/cm² auf die Membran gegeben. Nach der 2. Antikörperreaktion folgte eine zwei- bis dreimalige gründliche Waschung der Membran auf dem Schüttler. Die immunoreaktiven Banden wurden mit einem Immunodetectionssystem von Pierce (Supersignal[®]West-Dura) sichtbar gemacht. Hierfür wurde die gewaschene Membran 30 Minuten in 10-20 µl Chemolumineszenz/cm² (Super Sensitive West Dura) eingelegt. Nach weiteren 30 Minuten wurde die Membran auf einen

Autoradiographie Film (XOMAT-AR®-Film) abgelichtet. Die Belichtungszeit lag zwischen 5 sec. - 16 h.

Um nachzuweisen, dass die gleiche Menge an Protein aufgetragen worden war, wurden die Membranen gestrippt und mit den Antikörpern gegen die jeweiligen unphosphorylierten Proteine inkubiert. Zum Strippen wurden die Membranen nacheinander für 30 Minuten in zwei verschiedenen Lösungen gewaschen. Die erste Lösung war eine 2 %ige SDS-Lösung mit 7 M Urea, die zweite Lösung war eine 10 %ige Essiglösung. Die Membranen wurden anschließend neutralisiert und wie oben beschrieben mit den jeweiligen Kaninchen-Antikörpern gegen STAT1 (1:20.000), STAT3 (1:40.000), STAT5 (1:40.000) und MAPK (1:40.000) inkubiert. Um die Banden sichtbar zu machen wurde der Peroxidase-konjugierte Esel-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:25.000) verwendet.

2.2.5 Luciferase-Assay

Prinzip

Es wurde eine transiente Transfektion mit einem ringförmigen DNA-Vektor durchgeführt, der u.a. ein Luciferase-Gen enthielt. In dem Kontrollvektor PGL war dem Luciferase-Gen kein Promotor-Gen vorgeschaltet, wohingegen in dem SOCS-Vektor das SOCS-Promotor-Gen dem Luciferase-Gen vorgeschaltet war.

Für die transiente Transfektion wurde ein kommerzielles Kit von der Fa. Qiagen (SuperFect Transfection Cat.Nr. 301307) verwendet. Das Prinzip dieser Transfektion beruhte auf einer Umhüllung des DNA-Plasmids mit einem rein positiv geladenen dendritenförmigen Molekül, dem SuperFect Reagent. Dieser stark positiv geladene Komplex kann von der negativen Membran eukaryontischer Zellen angezogen und in die Zelle geschleust werden. In der Zelle fusioniert der Komplex und mit den Endosomen, wobei die lysosomalen Nukleasen inhibiert werden. Dadurch kann eine stabile Aufnahme des Komplexes in den Nukleolus gewährleistet werden. Für die Effizienz der Transfektion waren das Verhältnis von DNA zu SuperFect Reagent sowie die Dauer der Transfektion wichtig. Diese Kriterien ebenso wie die optimale Zellzahl mussten vor Versuchsbeginn ausgetestet werden.

Die Dichte der Zellaussaat wurde zu Anfang wie in o.g. Versuchen mit $0,35 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Gewebekulturplatte gewählt. Da die Zellen jedoch durch die Transfektion einen starken Wachstumsreiz erhielten, bestand vor Versuchsbeginn ein konfluenter Zellrasen. In diesem Zustand war eine Stimulation der Zellen nicht mehr möglich, so dass die Dichte der Zellaussaat verringert wurde.

Bei einer Zellaussaat von $0,3 \times 10^6$ Zellen in 6-Loch-Gewebekulturplatten ergab sich zu Stimulationsbeginn eine 75 %ige Konfluenz. Die Stimulation der Y-1 Zellen mit Interleukinen war zu diesem Zeitpunkt optimal.

Das Verhältnis von DNA zu Transfektions Reagenz wählten wir 1:5, da bei einem Verhältnis von 1:2 die Transfektionsrate zu gering aufgrund der zu niedrigen positiven Ladung des Transfektionskomplexes war.

Die Transfektionszeit wurde auf 3 h gewählt. Es folgte eine 24 - 30 stündige Inkubation in Wachstumsmedium bei 37°C und 5 % CO₂, damit sich die Zellen von dem Stress der Transfektion erholen konnten. 12 h vor der Stimulation mit den Interleukinen wurden die Zellen auf serumfreies Medium gesetzt.

Eine Transfektionszeit von 3 h und anschließend sechsständiger Inkubation in Wachstumsmedium wurde von den Y-1 Zellen ebenso wenig toleriert wie eine Transfektionszeit von 6 h und sofortige Umsetzung auf serumfreies Medium für 12 h.

Transiente Transfektion

Im exponentiellen Wachstum begriffene Y-1 - Zellen wurden 24h vor Transfektionsbeginn in einer Konzentration von $0,3 \times 10^6$ pro Loch in einer 6-Loch Gewebekulturplatte mit je 2 ml Wachstumsmedium ausgesät. Vor Versuchsbeginn bestand eine Semikonfluenz der Zellen mit 80 %iger Zelldifferenzierung.

Die Transfektion wurde nach dem Superfect Transfektions Protokoll der Fa. Qiagen (Cat. Nr.: 301307) durchgeführt. Laut Protokoll wurden 2 µg DNA pro Loch für eine Transfektion in einer 6-Loch-Zellkulturplatte verwendet.

Die entsprechende Menge von DNA wurde in ein 15 ml bzw. 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und auf 100 µl pro 2µg DNA mit reinem Hams F10 Medium aufgefüllt. Das Medium durfte kein Serum, BSA und keine Antibiotika enthalten, damit die Ausbildung der DNA-Transfektions-Komplexe nicht gestört wurde.

Der DNA-Suspension wurden zu je 2 µg DNA 10 µl SuperFect Reagent tropfenweise dazu pipettiert. Diese Suspension wurde für 10 Sekunden gevortext und dann bei Raumtemperatur 10 Minuten stehen gelassen, um die Komplexbildung von DNA und Transfektionslösung abzuwarten.

Das Wachstumsmedium wurde von den Zellen abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit ca. 1 ml 37°C warmer PBS gewaschen. Kurz vor der Zugabe der Transfektionslösung wurde das PBS abgesaugt.

Nach der Präzipitierung zwischen DNA und SuperFect Reagent wurden 600 µl Wachstumsmedium pro 2 µg DNA dazupipettiert. Die Suspension wurde durch Pipettieren

vermischt. Pro Loch in der Gewebelochplatte wurden 710 µl der DNA-Transfektionslösung auf die Zellen gegeben. Die Zellen waren so mit Transfektionslösung knapp bedeckt und wurden für 3 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach drei Stunden wurde die Transfektionslösung abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit je 2 ml Wachstumsmedium pro Loch für ca. 24 h inkubiert. Nach der Transfektion waren die Zellen etwas entdifferenziert, in dem sie kugelig verformt waren.

Die Y-1 Zellen erholten sich bis zu Stimulation mit den jeweiligen Interleukinen wieder: Sie befanden sich zu Versuchsbeginn wieder entdifferenziert im Zellverband. Nach 24h waren die Zellen dreiviertelkonfluent und nahezu 100 % differenziert. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen auf serumfreies Medium umgesetzt. Hierfür wurde nur BSA mit weniger als 1 % Endotoxin verwendet, um eine Stimulation der Zellen durch Endotoxine aus dem Medium zu vermeiden. Das Medium hatte einen Gehalt von 0,1 % BSA und wurde in einer Menge von 2 ml pro Loch dazugegeben. Die Inkubation mit serumfreiem Medium erfolgte für 12 h über Nacht.

Nach 12 h wurden die Zellen nochmals wie oben beschrieben auf frisches serumfreies Medium umgesetzt, um eventuelle Reste des Wachstumsmediums oder auch von den Zellen selbst produzierte Endotoxine zu entfernen. Es wurden exakt 2 ml Medium pro Loch mit einer Multipipette dazugegeben und die jeweiligen Interleukine in einer Konzentration von 10 ng/ml dazupipettiert. Die Zellen wurden für 6 h mit den Interleukinen inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt, die 6-Loch-Zellkulturplatten sofort auf Eis gestellt und für 10 Minuten mit 210 µl Lysispuffer pro Loch behandelt.

Der Lysispuffer bestand aus 1,25 ml 1 M Tris (pH 7,8), 7,5 ml 87 % Glycerol, 500 µl 1 M MgCl₂, 500 µl Triton X 100, 100 µl 0,5 M EDTA (pH 8) und wurde mit aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt. Das Triton bewirkte unter anderem das Anschwellen und Platzen der Zellen, wodurch das Zytosol mit den entsprechenden Proteinen, hier vor allem dem Luciferin, frei wurde. Die Lyse wurde auf Eis durchgeführt, um Proteasen zu inaktivieren.

Nach der zehnminütigen Inkubation wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und die jeweilige Zellsuspension in einem Eppendorf-Cup bei -80°C eingefroren. Sowohl beim Abkratzen als auch durch das Einfrieren und wieder Auftauen gingen weitere Zellen kaputt, so dass von einer maximalen Ausbeute an Luciferin aus dem Zytosol ausgegangen werden konnte.

Messung

Die Messung der Luciferaseaktivität wurde an einem Luminometer (Typ: Lumat LB 9507) vorgenommen. Es wurden 10 µl auf Eis aufgetautes Lysat in die Messröhrchen vorpipettiert. Vor jeder Messung wurde der Meßpuffer unter abgedunkelten Bedingungen neu hergestellt (6,6 ml Lysispuffer, 83 µl 100 mM ATP, 30 µl 10 mM Luciferin mit aqua dest auf 10 ml aufgefüllt), um das Luciferin nicht schon vor der Messung zu inaktivieren. Zur Messung wurden je Röhrchen 100 µl Luciferase-Meßpuffer zu der Probe dazupipettiert und nach einer definierten Zeit gemessen. Die Luciferaseaktivität wurde in RLU gemessen.

2.2.6 Northern Blot

Die Zellkultur wurde wie für die RNA-Extraktion vorbereitet. 16 h vor Stimulationsbeginn wurden die Y-1 Zellen mit serumfreiem Medium behandelt. Zum Stimulationszeitpunkt wurde ein nochmaliger Wechsel auf serumfreies Medium durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen für 30, 60 und 90 Minuten mit 10 ng/ml Interleukin-11 bzw. -6 inkubiert. Zu jedem Zeitpunkt wurde die mRNA von unbehandelten Zellen als Negativkontrolle extrahiert. Die Extraktion der SOCS3-mRNA wurde nach dem oben beschriebenen Protokoll der RNA-Extraktion durchgeführt.

20 µg mRNA wurde mittels Gelelektrophorese auf einem 1 %-Agarose-6,4 %- Formamid-Gel aufgetrennt. Zur optischen Kontrolle der Qualität der mRNA wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

Der Blot vom Gel auf eine Nylon Membran (Hybond-N+, Amersham) wurde 16 h über Nacht durchgeführt. Sowohl die Membran als auch das Gel wurden unter UV-Licht fotografiert, um einen erfolgreichen Transfer der mRNA nachzuweisen. Die Membran wurde zuerst in einem Reduktionspuffer bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend mit einem Neutralisationspuffer behandelt. Zum Crosslinken der RNA wurde die Membran von beiden Seiten unter einem UV-Crosslinker von Stratagene bestrahlt. Danach wurde die Membran in der QuikHyp-Lösung von Stratagene für 2 h bei 68°C prehybridisiert. Die mit ³²P markierte DNA-Sonde wurde mit 100 µg denaturierter Lachsspermien-DNA für 2 Minuten auf 95°C aufgeköcht. Die DNA-Sonde wurde in die Prehybridisierungslösung dazupipettiert. Die Membran wurde in der Prehybridisierungslösung mit der markierten DNA-Sonde für 16 h über Nacht hybridisiert.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran zweimal für 20 Minuten in einer hochkonzentrierten 2 x SSC-0,1 % SDS-Lösung bei Raumtemperatur gewaschen.

Anschließend wurde die Membran für 40 Minuten in einem 0,1 x SSC-0,1 % SDS-Puffer bei 60°C inkubiert.

Die in Plastikfolie eingeschweißte Membran wurde für 10 Sekunden bis 16 h auf einem Kodak BIOMAX MS1 Film bei -70°C exponiert.

Zum Strippen wurde die Membran zweimal für 15 Minuten in einem 0,1 x SSC-0,1 % SDS-Puffer gekocht. Es folgte die Pre- und Hybridisierung wie oben beschrieben allerdings mit der ³²P markierten Sonde von Ambion, die an das Gen des murinen Beta-Aktin bindet.

³²P-Markierung der DNA-Sonde für den Northern Blot

Das murine SOCS3 DNA-Fragment, das von Basenpaar 19-610 reicht (GeneBank Accession U88328), wurde wie schon beschrieben (Auernhammer et al., 1998a) durch RT-PCR gewonnen und mittels Sequenzanalyse verifiziert. Die β -actin DECA-Probe war ein 1076-kb großes Fragment des murinen β -Actin-Gens (Ambion, Cambridgeshire, UK).

Die cDNA des SOCS3-PCR-Produktes wurde nach dem DECAPrime II Protokoll von Ambion mit $^{*}[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$'s markiert. Mittels QIAquick Nucleotide Removing Kit (Qiagen) wurden die überflüssigen, nicht in die Sonde eingebauten radioaktiven dCTP's entfernt. Übrig blieb ³²P-markiertes SOCS3 als doppelsträngige DNA-Sonde.

2.2.7 Stabile Calcium-Phosphat-Transfektion

Es wurden Y-1 Zellen mit einem durch den CMV-Promotor aktivierten pCR3.1-Topo Vektor (Invitrogen) stabil transfiziert. Dieser enthielt ein 748 bp großes, die gesamte cDNA von SOCS-3 umfassendes Fragment (GeneBank, Acc. U88328, bp15 - 762). Der Kontroll-Vektor entsprach dem blanden pCR3.1-Topo Vektor. Beide enthielten das Resistenzgen für Neomycin.

Es wurden Y-1 Zellen im exponentiellen Wachstum begriffen nach der Calcium-Phosphatmethode der Current Protocols (Current Protocols in Molecular Biology, 1990, Kap. 9.1 und 16.3 ff) stabil mit den o.g. Vektoren transfiziert. Hierzu wurden 2×10^6 Y-1 Zellen in 10 cm-Zellkulturplatten ausgesät. Als sie in exponentiellem Wachstum begriffen waren, wurde die Transfektion durchgeführt. Hierzu wurden jeweils sechs Zellplatten auf frisches Wachstumsmedium umgesetzt. Anschließend wurde die Transfektion mit jeweils 20 μg DNA pro 10 cm-Zellkulturplatte durchgeführt. Dazu wurde die DNA in 0,1xTE-Puffer (1 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) auf eine Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aufgelöst. 220 μl der DNA-Suspension wurden mit 250 μl 2xHEPES-Puffer und 31 μl 2M Ca-Cl-Lösung gemischt und bei Raumtemperatur für 20-30 Minuten inkubiert, damit sich die Calcium-Phosphat-

Präzipitate ausbilden konnten. Anschließend wurde jeweils 1ml der DNA-Ca-P-Suspension, in dem 20 µg DNA enthalten waren, auf die Y-1 Zellen (in 10 cm Platten) pipettiert. Es folgte eine Übernachtinkubation von 16 Stunden. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Entsprechend dem Protokoll folgte nun der Glycerolschock, in dem jeweils 3,0 ml 15%iges Glycerol (in 1xHEPES gelöst) den Zellplatten zugefügt wurden. Die Glycerolinkubation dauerte 2 Minuten. Anschließend wurde das Glycerol abgesaugt, die Zellen erneut in PBS gewaschen und mit neuem Wachstumsmedium für 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte der erste Mediumwechsel auf neomycinhaltiges Selektivmedium. Dazu wurde sowohl die Neomycinkonzentration von 200 µg/ml als auch 500 µg/ml verwendet. Die Zellen wurden über 16 Tage gezüchtet bei regelmäßigem zwei- bis dreitägigem Mediumwechsel. Nach dieser Zeit wurden sie trypsiniert und neu ausgesät. Nach weiteren sieben Tagen Wachstumszeit konnten einzelne Klone ausgemacht werden, die nun isoliert und neu ausgesät wurden. Es wurden die Klone S1-11, 26-32 (enthielten die DNA für SOCS) und N12-17, 18-25 (enthielten nur den Kontroll-Vektor mit der Neomycinresistenz) selektioniert und weiter in neomycinhaltigem Medium gezüchtet.

Um eine erfolgreiche Transfektion nachweisen zu können, wurde ein Pool aus S- bzw. N-Klonen gebildet und wie oben beschrieben für eine RNA-Extraktion mit anschließendem Northern Blot verwendet.

Ebenso wurden diese Zellen wie oben beschrieben für einen Radioimmuno-Assay verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis von gp130- und IL-11-Rezeptor in Nebennierenrindenzellen

3.1.1 gp130- und IL-11R-Nachweis mittels RT-PCR in Y-1 Zellen und muriner NNR

Für den Nachweis des IL-11-Rezeptors mittels Reverser Transkriptase und Polymerase Chain Reaktion (RT-PCR) wurde die mRNA unstimulierter Y-1 Zellen wie auch die mRNA aus murinen Nebennierenrindenzellen von C57BL/6 Mäusen bearbeitet.

Um die mRNA des IL-11-Rezeptors nachzuweisen, wurden Primer (Abb. 13) verwendet, die für beide Rezeptor-Isoformen, IL-11-R α und IL-11-R α 2, kodieren. Es konnte somit ein 588bp großes PCR-Produkt der cDNA für den murinen IL-11-R generiert werden. (bp 304-891, GenBank Acc. UU14412).

Mit den spezifischen Primern (Abb. 13) für den murinen gp130-R wurde ein PCR-Produkt von 459bp aus der murinen cDNA nachgewiesen. Die gesamte cDNA des gp130-R ist in der GenBank unter der Accession-Nummer X62646 zu finden.

Die RT-Negativkontrollen wiesen in beiden Fällen keine DNA-Verunreinigungen auf. Die RT-Negativkontrolle ist sowohl in Abb. 14 für den gp130-R als auch in Abb. 15 für den IL-11-R dargestellt.

GeneBank Acc.: U14412

Muriner IL-11-R sense (bp 304-325)	5'-CTGATGAAGGCACTTATGTCTG-3'
Muriner IL-11-R antisense (bp 869-891)	5'-CATCTGTTATCACTTCCTCCAAG-3'

GeneBank Acc.: X62646

Muriner gp130-R sense (bp 1774-1792)	5'-GGAGATGGTTGTGCATGTG-3'
Muriner gp130-R antisense (bp 2402-2421)	5'-GACCTTGAGAACACTTGCAC-3'

GeneBank Acc.: U03421

Murines IL-11 sense (bp 200-220)	5'-CAGACACACGGCAACTAGCTG-3'
Murines IL-11 antisense (bp 744-764)	5'-GTTGTTTGGGGTGTGGCATGC-3'

Abb. 13: Primersequenzen (Sense und Antisense) mit den Angaben der GeneBank Nummern und Basenpaarsequenzen (bp) innerhalb des jeweiligen Gens

3.1.2 Restriktion der RT-PCR-Produkte

Die PCR-Produkte sowohl des gp130-R als auch des IL-11-R wurden zur Spezifizierung aus dem Gel extrahiert und anschließend mit dem Restriktionsenzym *NcoI* behandelt, das zwischen einem Nukleotid „C“ und der anschließenden Nukleotidfolge von „TCGAG“ schneidet. Diese Sequenz kam in beiden Genen nur einmal vor, so dass sich nach der Restriktion jeweils zwei unterschiedlich große DNA-Fragmente ergaben.

Das 459 Basenpaar(bp)-Produkt des gp130-R wurde mit 20 Units des Restriktionsenzym *NcoI* in die erwarteten Fragmente von 298 bp und 161 bp Länge geschnitten. (Abb. 14)

RT-PCR-Nachweis des gp130-Rezeptors

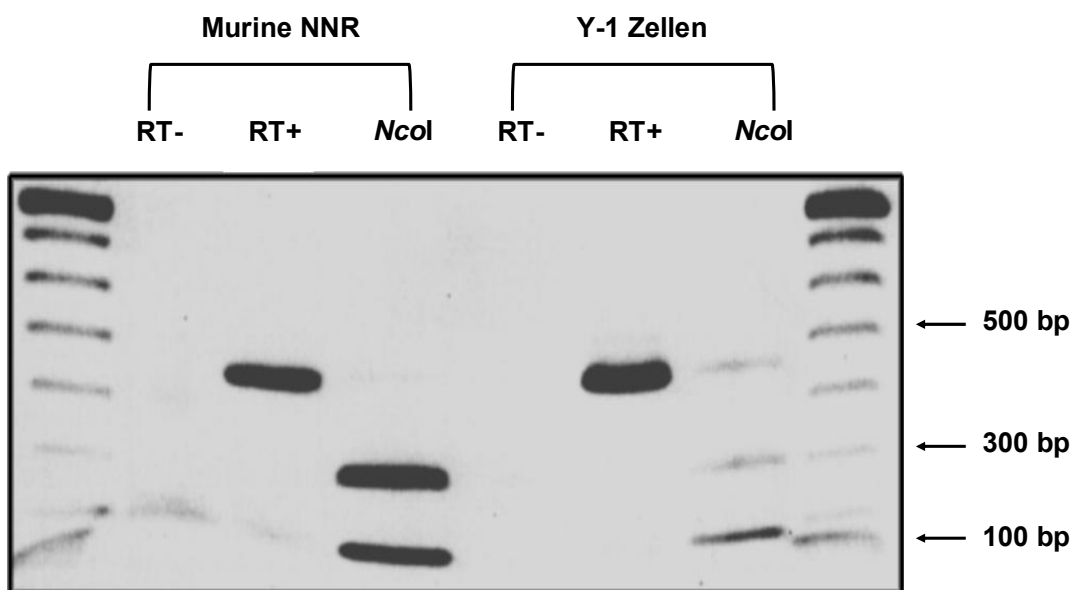


Abb. 14: Mittels Reverser Transkriptase und Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) konnte der 495bp lange gp130-Rezeptor, sowie der fragmentierte gp130- Rezeptor mit einem 298 bp- und einem 161 bp-Fragment nach der Behandlung mit dem Restriktionsenzym *NcoI* in murinem Nebennierenrindengewebe und Y1-Zellen nachgewiesen werden. Am Rand des Ethidiumbromid-Agarosegels ist ein 100bp-Marker aufgetragen worden.

Durch die Verdauung des IL-11-Rezeptor-Gens ebenfalls mit 20 Units *NcoI* wurde das 588bp- Produkt in 300 bp und 288 bp fragmentiert, die als Doppelbande erscheinen. (Abb. 15)

RT-PCR-Nachweis des IL11-Rezeptors

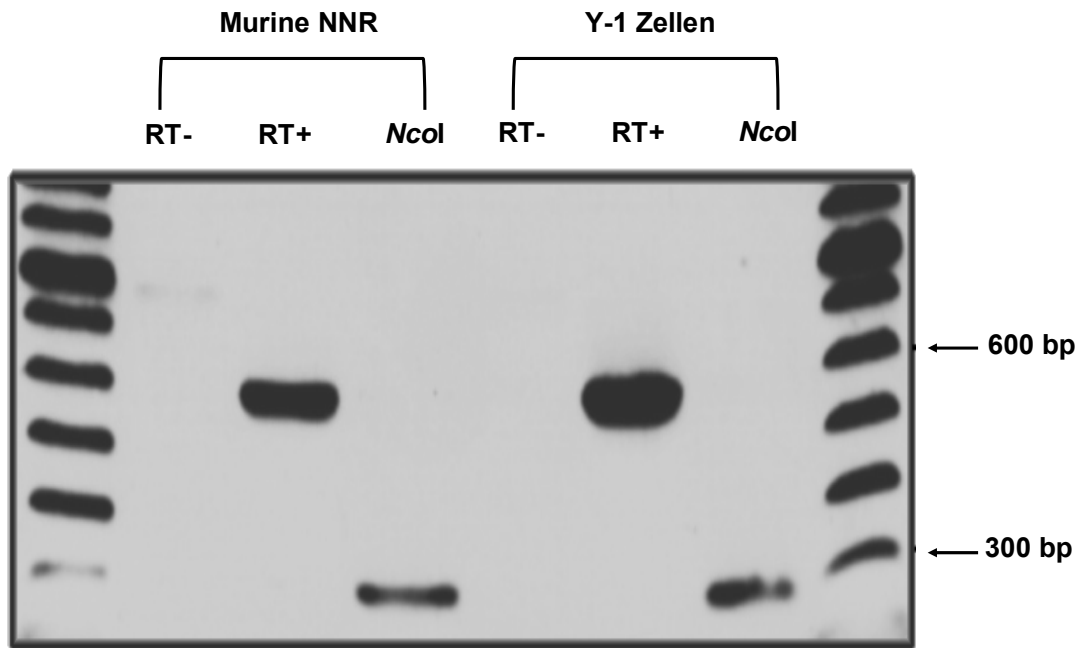


Abb. 15: Die Expression des IL-11-Rezeptors in primären murinen Nebennierenrindenzellen und Y-1 Zellen konnte ebenfalls mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Der 588bp große IL-11-Rezeptors und der fragmentierte IL-11-R sind als Photographie (mit UV-Filter) des Ethidiumbromid-Agarosegels dargestellt. Nach Behandlung des IL-11-R mit dem Restriktionsenzym *NcoI* entstanden die 300 bp und 288 bp langen Fragmente (hier als Doppelbande) des IL-11-Rezeptors. Am Rand sind jeweils die 100 bp-Marker dargestellt.

3.2 Nachweis von IL-11 in Y-1 Zellen und muriner Nebennierenrinde

Es konnte gezeigt werden, dass auch in nicht vorbehandelten NNR- und Y-1 Zellen IL-11 autokrin produziert wird. Die Quantität des IL-11 konnte mittels PCR nicht bestimmt werden, allerdings war der Nachweis bei gleicher Menge eingesetzter mRNA wie für die Rezeptorbestimmungen sehr schwierig zu führen.

Das IL-11-Gen wurde mit den spezifischen Primern (Abb. 13) aus der GeneBank (Accession-Nummer U03421) transkribiert. Die RT-Negativkontrolle hatte bei der PCR keine DNA-Verunreinigungen aufgedeckt. Es wurde das erwartete 565 bp große Fragment amplifiziert.

Dieses PCR-Produkt ließ sich nach der Gelextraktion mittels 20 Units des Restriktionsenzym *ApaI* in die gewünschten 228 bp- und 337 bp-Fragmente schneiden (Abb. 16).

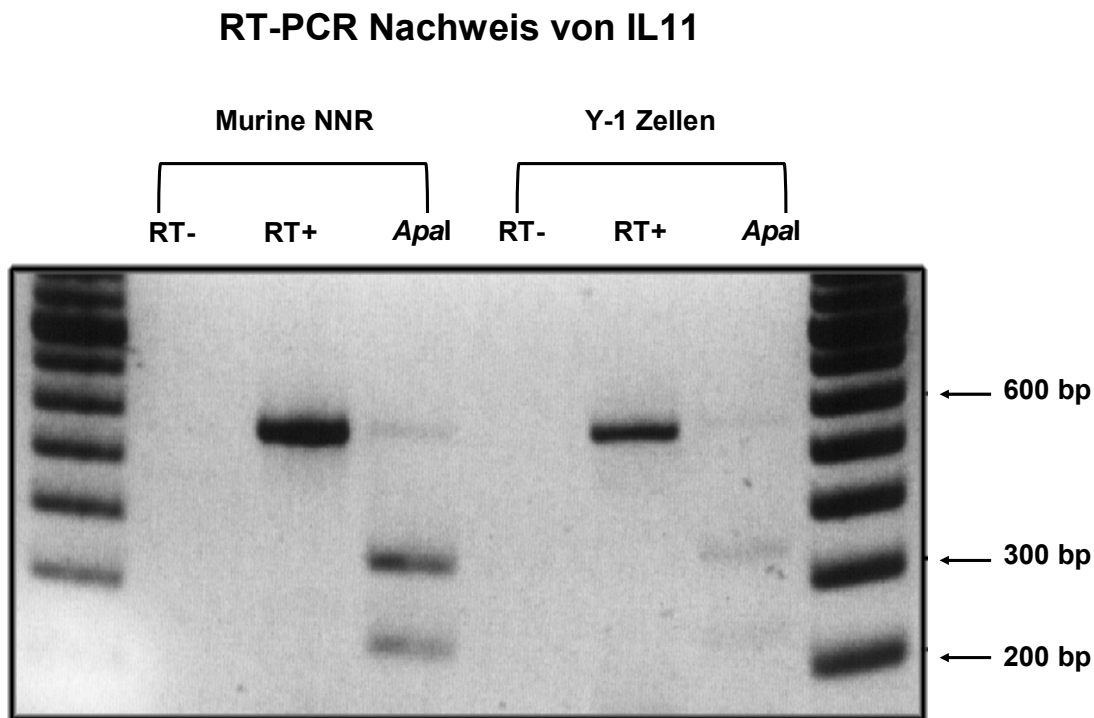


Abb. 16: Die Expression des *IL-11*-Gens und damit autokrine Produktion von *IL-11* konnte mittels RT-PCR in primären murinen Nebennierenrindenzellen und Y-1 Zellen nachgewiesen werden. Bei gleicher Menge mRNA waren die Banden hier jedoch geringer ausgeprägt als bei dem Nachweis der Oberflächenrezeptoren. Hier ist das 565 bp *IL-11*-Genfragment und die fragmentierten Teile von *IL-11* in 228 bp und 337 bp nach Behandlung mit dem Restriktionsenzym *ApaI* in murinem Nebennierenrindengewebe und Y-1 Zellen auf einem Ethidiumbromid-Agarosegel dargestellt.

3.3 *Interleukin-11* stimuliert die Steroidsekretion von murinen NNR-Zellen

3.3.1 Dosisabhängige Wirkung von Interleukin-11 auf die Steroidproduktion

Mit diesem Versuchsaufbau soll gezeigt werden, dass *IL-11* die Steroidproduktion von murinen NNR Y-1 Zellen dosisabhängig stimulieren kann. Jeder Versuch wies in den einzelnen Versuchsgruppen $n = 6$ auf. Es gab neun verschiedene Versuchsgruppen, von denen sieben mit ansteigenden *IL-11* Konzentrationen von 0,01 ng/ml ($= 0,5 \times 10^{-12}$ M) bis 50 ng/ml ($= 2,5 \times 10^{-9}$ M) inkubiert wurden. Die Zellen der Positivkontrolle wurden mit 10^{-7} M ACTH zur Steroidproduktion angeregt. Der Negativkontroll-Gruppe wurde serumfreies Medium dazu pipettiert. Die Steroidproduktion wurde zu den Zeitpunkten 24 h, 36 h und 48 h aus dem Zellkulturüberstand der Y-1 Zellen mittels Radioimmuno-Assay bestimmt.

Die Steroidproduktion sowohl der ACTH - Gruppe, als auch der Gruppen mit ansteigenden IL-11 Konzentrationen wurde in Bezug zur Steroidproduktion der Kontrollgruppe zu dem jeweiligen Zeitpunkt gesetzt. Damit wurde eine Steigerung der Hormonproduktion gegenüber der Basalrate zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Die Versuche wurden sowohl einzeln als auch gesamt mittels t-Test für unverbundene Stichproben ausgewertet. In der Gesamtauswertung zeigte sich zu allen drei Zeitpunkten eine dosisabhängige Steigerung der Steroidproduktion gegenüber der Basalrate (Abb. 17).

Nach 24 Stunden lag der durchschnittliche Basalwert bei $0,90 \pm 0,1$ ng/ml Steroidsekretion. Durch Interleukin-11 konnte eine dosisabhängige ($0,01$ ng/ml bis 50 ng/ml) Steigerung der Steroidsekretion von im Durchschnitt $0,98 \pm 0,1$ ng/ml auf $1,24 \pm 0,1$ ng/ml nachgewiesen werden. Ab 10 ng/ml Interleukin-11 lag eine signifikante Steigerung ($p < 0,01$) mit $1,10 \pm 0,1$ ng/ml Steroid vor. Somit bewirkte Interleukin-11 dosisabhängig einen relativen Anstieg um das 1,2- bis 1,5-fache. ACTH bewirkte nach 24h Inkubationszeit eine durchschnittliche Sekretion von $4,56 \pm 0,4$ ng/ml ($p < 0,001$), welches einem relativen Anstieg um das 5,5-fache entspricht.

Nach 36 Stunden lag der durchschnittliche Basalwert bei $1,01 \pm 0,1$ ng/ml Steroidsekretion. Durch Interleukin-11 konnte eine dosisabhängige ($0,01$ ng/ml bis 50 ng/ml) Steigerung der Steroidsekretion von im Durchschnitt $1,16 \pm 0,1$ ng/ml auf $1,63 \pm 0,1$ ng/ml nachgewiesen werden. Bei 10 ng/ml Interleukin-11 lag eine signifikante Steigerung ($p < 0,001$) mit $1,83 \pm 0,1$ ng/ml Steroid vor. Somit bewirkte Interleukin-11 dosisabhängig einen relativen Anstieg um das 1,2- bis 1,9-fache. ACTH bewirkte nach 36h Inkubationszeit eine durchschnittliche Sekretion von $4,88 \pm 0,4$ ng/ml ($p < 0,001$), welches einem relativen Anstieg um das 5,6-fache entspricht.

Nach 48 Stunden lag der durchschnittliche Basalwert bei $1,51 \pm 0,1$ ng/ml Steroidsekretion. Durch Interleukin-11 konnte eine dosisabhängige ($0,01$ ng/ml bis 50 ng/ml) Steigerung der Steroidsekretion von im Durchschnitt $1,40 \pm 0,1$ ng/ml auf $2,33 \pm 0,1$ ng/ml nachgewiesen werden. Bei 10 ng/ml Interleukin-11 lag eine signifikante Steigerung ($p < 0,01$) mit $2,03 \pm 0,1$ ng/ml Steroid vor. Somit bewirkte Interleukin-11 dosisabhängig einen relativen Anstieg um das 0,9- bis 1,5-fache. ACTH bewirkte nach 36h Inkubationszeit eine durchschnittliche Sekretion von $6,08 \pm 0,5$ ng/ml ($p < 0,001$), welches einem relativen Anstieg um das 4,2-fache entspricht.

Die Steroidproduktion zeigte einen dosisabhängigen Verlauf und war zu allen drei Zeitpunkten ab $1,0$ ng/ml mit $p < 0,05$ signifikant. Die stärkste Steigerung der Steroidproduktion zeigte sich zu allen drei Zeitpunkten ab 10 ng/ml (Abb. 17).

Dosisabhängige Steroidsekretion in Y-1 Zellen durch Interleukin-11

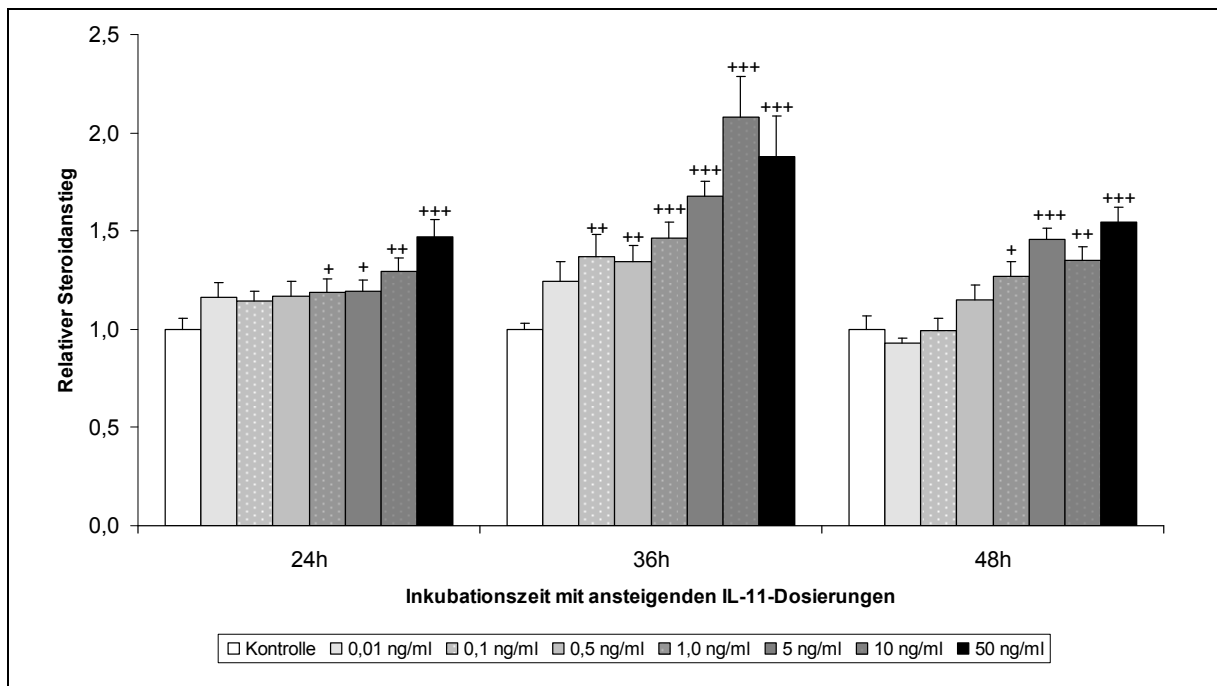


Abb. 17: Die Steroidsekretion in adrenokortikalen Y-1 Zellen erwies sich als dosisabhängig durch Interleukin-11-Stimulation von 0,01 ng/ml bis 50 ng/ml. Zu den Zeitpunkten 24h, 36h und 48h wurde die Steroidmenge im Zellkulturüberstand mittels Radioimmuno-Assay gemessen. Hier ist der errechnete relative Anstieg an produziertem Steroid (siehe Text) im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe graphisch dargestellt. Ab 1,0 ng/ml lag zu allen drei Zeitpunkten eine Signifikanz von $p < 0,05$ (+) vor. Ab 10 ng/ml lag eine Signifikanz von $p < 0,01$ (++) bis $p < 0,001$ (+++) vor. ACTH bewirkte als Positivkontrolle zu allen drei Zeitpunkten einen signifikanten Anstieg der Steroidproduktion gegenüber der Basalrate: nach 24h bewirkte ACTH einen 5,5-fachen Anstieg, nach 36h einen 5,6-fachen Anstieg und nach 48h einen 4,2-fachen Anstieg jeweils mit $p < 0,001$ (graphisch nicht dargestellt).

3.3.2 Zeitliche Wirkung von Interleukin-11 auf die Steroidproduktion

Im Dosisverlauf konnten wir feststellen, dass Interleukin-11 in einer Konzentration von 10 ng/ml die Steroidproduktion der Y-1 Zellen signifikant stimuliert. Als nächstes sollte die zeitliche Wirkung von Interleukin-11 auf die Steroidproduktion der Y-1 Zellen untersucht werden.

Die einzelnen Versuchsgruppen enthielten $n = 6$ mit einer randomisierten Verteilung. Es wurde 10^{-7} M ACTH als Positivkontrolle und serumfreies Medium als Negativkontrolle verwendet. Die Inkubation mit Interleukin-11 wurde in einer Konzentration von 10 ng/ml durchgeführt.

Die Steroidsekretion wurde nach 12 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h aus dem Zellkulturüberstand mittels Radioimmuno-Assay ermittelt.

Nach 12 h war die Steroidsekretion so gering, dass die Messwerte vor allem in der Kontrollgruppe und der IL-11- Gruppe häufig außerhalb der Standardkurve lagen. Aus diesem Grund wurden diese Ergebnisse nicht verwendet. Nach 72 h konnte in allen Versuchsgruppen ein starker Anstieg der Steroidmenge und vor allem eine große Standardabweichung verzeichnet werden. Sowohl durch ACTH als auch durch Interleukin-11 konnte keine wesentliche Erhöhung der Steroidausschüttung mehr erzielt werden. Mikroskopisch zeigte sich in der Zellkultur ein vermehrter Ablösungsprozess und damit verbundener Zelltod. Da wir hier von einem falsch positiven Ergebnis durch Zelltod und damit vermehrter Freisetzung an Steroiden ausgehen, werden die Ergebnisse nach 72 h Inkubationszeit nicht in die Auswertung aufgenommen.

Sowohl für die Einzel- als auch die Gesamtauswertung der Versuche wurde der t-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Es konnte eine signifikante Erhöhung der Steroidproduktion durch IL-11 in der Gesamtauswertung zu den Zeitpunkten 24 h, 36 h und 48 h mit $p < 0,001$ festgestellt werden (Abb. 18).

Nach 24 h ergab sich eine basale Steroidsekretion von $0,5 \pm 0,1$ ng/ml, Interleukin-11 bewirkte eine Sekretion von $0,70 \pm 0,1$ ng/ml, das entspricht einer Steigerung um das 1,33-fache ($p < 0,001$).

Nach einer Inkubationsdauer von 36 h bzw. 48 h konnte die basale Steroidsekretion von $0,7 \pm 0,1$ ng/ml bzw. $0,9 \pm 0,1$ ng/ml durch Interleukin-11 um das 1,50-fache bzw. um das 1,55-fache auf $1,11 \pm 0,1$ ng/ml bzw. $1,32 \pm 0,1$ ng/ml signifikant erhöht werden ($p < 0,001$).

ACTH bewirkte nach 24 h eine 6,8-fache Steigerung ($p < 0,001$) der basalen Steroidproduktion mit $3,16 \pm 0,3$ ng/ml. Nach 36 h bzw. 48 h konnte eine 5,9-fache bzw. 4,8-fache Erhöhung der Steroidsekretion ($p < 0,001$) mit $3,70 \pm 0,3$ ng/ml bzw. $4,02 \pm 0,4$ ng/ml verzeichnet werden (Abb. 18).

Zeitverlauf der Steroidsekretion von Y-1 Zellen nach Inkubation mit Interleukin-11

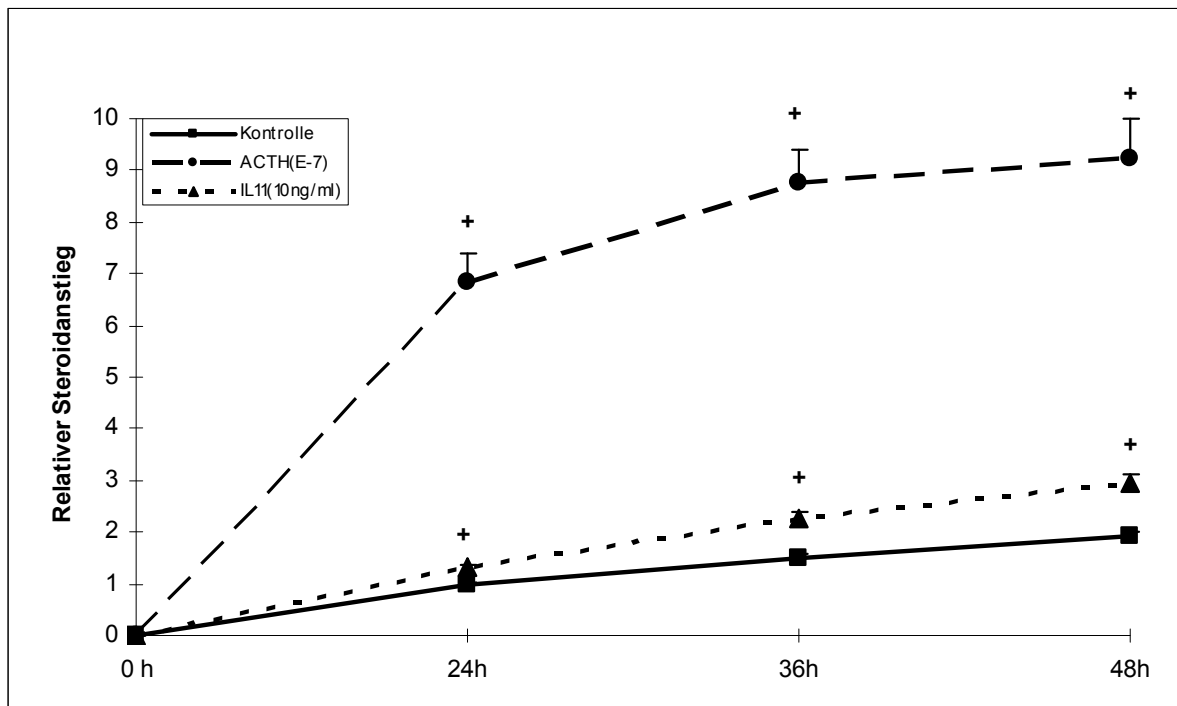


Abb. 18: Hier ist der zeitliche Verlauf der Steroidsekretion durch Y-1 Zellen nach Inkubation mit 10 ng/ml Interleukin-11 dargestellt. Schon ab 24 h zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Steroidsekretion mit $p < 0,001$ (+) gegenüber der Kontrollgruppe. ACTH als Positivgruppe stellte sich als sehr potenter Stimulus der Steroidsekretion dar.

3.3.3 Synergistischer Effekt von Interleukin-11 und ACTH auf die Steroidsekretion

ACTH und IL-11 stimulieren die Steroidproduktion in Nebennierenrindenzellen über zwei unterschiedliche Signalkaskaden. Das führte zu der Fragestellung, ob man durch gleichzeitige Inkubation der Y-1 Zellen mit ACTH und IL-11 eine additive oder synergistische Steigerung der Steroidproduktion bewirken kann.

Für diesen Nachweis wurden Y-1 Zellen über einen Zeitraum von 24 h bis 48 h mit 10 ng/ml IL-11, 10^{-7} M ACTH sowie 10 ng/ml IL-11 plus 10^{-7} M ACTH inkubiert. Als Negativkontrolle fungierte serumfreies Medium.

In der Gesamtauswertung ergab sich zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Erhöhung der Steroidproduktion durch die Ko-Inkubation von IL-11 und ACTH gegenüber der alleinigen Inkubation mit ACTH (Abb. 19).

Ko-Inkubation der Y-1 Zellen mit Interleukin-11 und ACTH

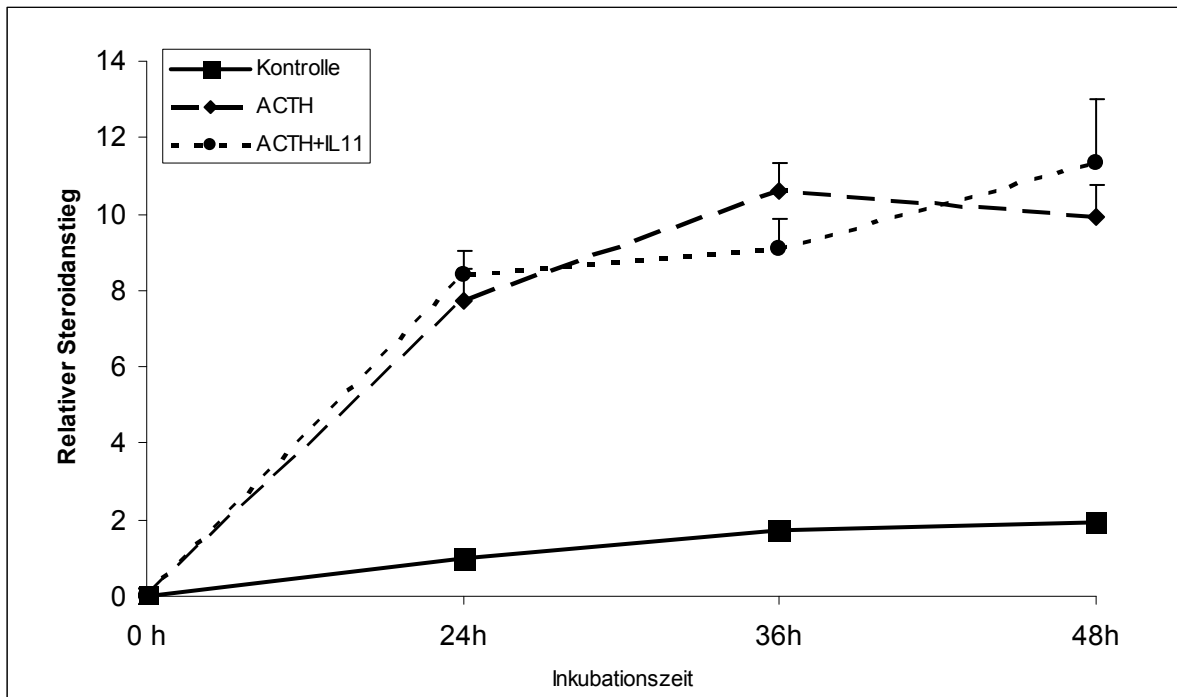


Abb. 19: Die Ko-Inkubation der Y-1 Zellen mit ACTH und Interleukin-11 erbrachte im zeitlichen Verlauf keinen synergistischen oder additiven Effekt.

3.4 Interleukin-6 stimuliert die Steroidsekretion von murinen NNR-Zellen

3.4.1 Dosisabhängige Wirkung von Interleukin-6 auf die Steroidproduktion

Die Y-1 Zellen wurden wie oben beschrieben kultiviert und für den Versuch in steigender Dosierung von 0,01 ng/ml (= $0,4 \times 10^{-12}$ M) bis 50 ng/ml (= 2×10^{-9} M) Interleukin-6 inkubiert. Als Negativkontrolle wurde serumfreies Medium und als Positivkontrolle 10^{-7} M ACTH verwendet. Nach 24 h, 36 h und 48 h wurde aus dem Zellkulturüberstand mittels Radioimmuno-Assay die von den Y-1 Zellen sezernierte Steroidmenge bestimmt.

Die Basalrate lag nach 24h bei $0,61 \pm 0,05$ ng/ml Steroid im Überstand. Nach 24 h konnte die Steroidausschüttung durch 0,01 ng/ml bis 50 ng/ml IL-6 um das 1,2- bis 2,5-fache von $0,75 \pm 0,1$ ng/ml auf $1,44 \pm 0,1$ ng/ml gesteigert werden. Ab 0,5 ng/ml lag eine signifikante Erhöhung der Steroidsekretion mit $p < 0,001$ vor. ACTH bewirkte zu diesem Zeitpunkt eine 4,8-fache ($p < 0,001$) Stimulation der Steroidproduktion auf $3,02 \pm 0,5$ ng/ml.

Die basale Steroidausschüttung lag nach 36 h bei $0,8 \pm 0,05$ ng/ml und konnte durch 0,01 ng/ml IL-6 auf $0,89 \pm 0,1$ ng/ml um das 1,2-fache gesteigert werden. 50 ng/ml Interleukin-6 bewirkten eine 3,1-fache Erhöhung der Steroidsekretion auf $2,32 \pm 0,2$ ng/ml.

Die Stimulierung durch Interleukin-6 war nach 36 h ab 5 ng/ml mit $p < 0,001$ signifikant. Durch 10^{-7} M ACTH konnte eine 4,4-fache Steroidausschüttung auf $3,4 \pm 0,3$ ng/ml erreicht werden ($p < 0,001$).

Die Inkubation mit Interleukin-6 in den o. g. Dosierungen ergab nach 48 h einen 0,9 - bis 3,0-fachen Anstieg der Steroidmenge von $0,73 \pm 0,05$ ng/ml auf $2,64 \pm 0,4$ ng/ml. Die Basalrate lag bei $0,83 \pm 0,1$ ng/ml. Ab 5 ng/ml Interleukin-6 waren die Ergebnisse signifikant ($p < 0,001$) erhöht. Eine 2,8-fache Steigerung der Steroidmenge auf $2,25 \pm 0,2$ ng/ml ergab sich nach 48-stündiger Stimulation mit ACTH ($p < 0,001$).

Die Steroidproduktion zeigte einen dosisabhängigen Verlauf und war zu allen drei Zeitpunkten ab 5 ng/ml mit $p < 0,001$ signifikant (Abb. 20).

Interleukin-6-dosisabhängiger Verlauf der Steroidsekretion durch Y-1 Zellen

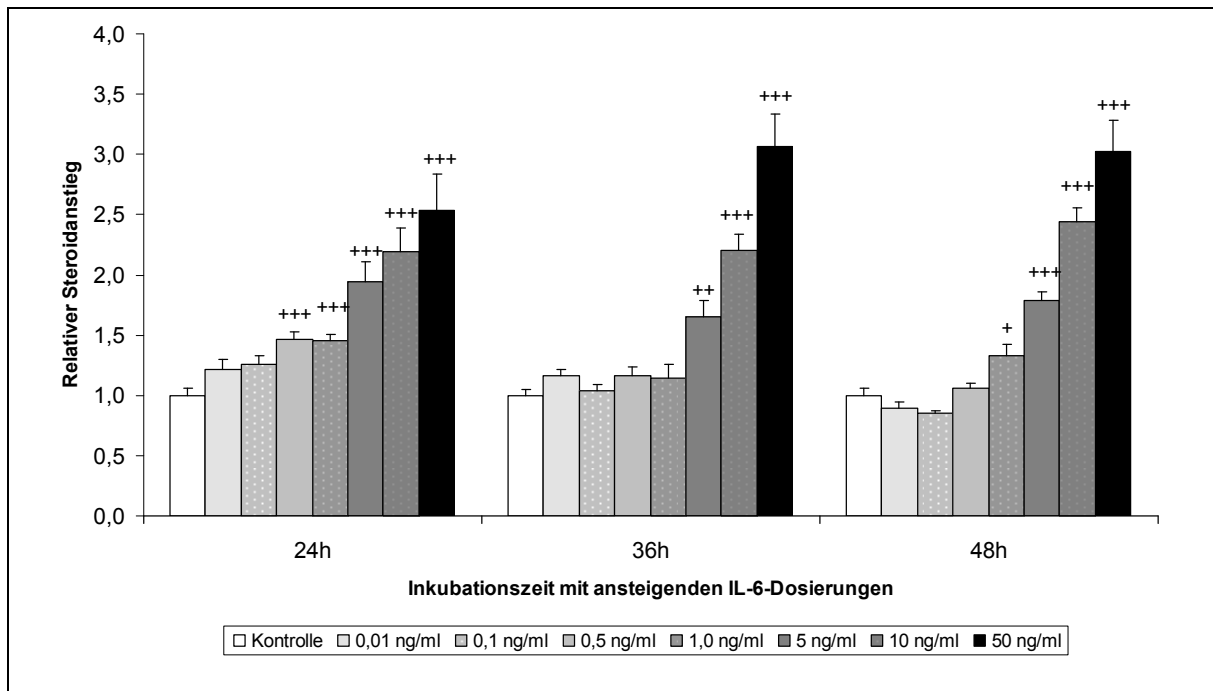


Abb. 20: Die Stimulation der adrenokortikalen Y-1 Zellen mit Interleukin-6 erwies sich als dosisabhängig. Graphisch dargestellt ist der errechnete relative Anstieg an produziertem Steroid im Vergleich zur Kontrollgruppe, gemessen mit einem Radioimmuno-Assay nach 24h, 36h und 48h. Die Steroidproduktion war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht mit $p < 0,01$ (+), $p < 0,001$ (++) und $p < 0,0001$ (+++). ACTH bewirkte nach 24h einen 4,8-fachen, nach 36h einen 4,4-fachen und nach 48h einen 2,8-fachen Anstieg der Steroidsekretion (graphisch nicht dargestellt). Mit 50 ng/ml Interleukin-6 konnte eine maximale relative Stimulation der Steroidproduktion erreicht werden. Insgesamt fiel die Sekretionsrate an Steroiden höher aus als für Interleukin-11. Es zeigte sich, dass Interleukin-6 gegenüber Interleukin-11 der potentere Stimulator der Steroidsekretion ist, da es früher und mit einer geringeren Menge an Interleukin zu einer relevanten Steroidsekretion kommt.

3.4.2 Zeitliche Wirkung von Interleukin-6 auf die Steroidproduktion

Es wurde die zeitliche Wirkung von Interleukin-6 in einer Konzentration von 10 ng/ml gemessen.

Die Steroidsekretion wurde nach 24 h, 36 h und 48 h aus dem Zellkulturüberstand mittels Radioimmuno-Assay ermittelt.

Sowohl für die Einzel- als auch die Gesamtauswertung der Versuche wurde der t-Test für unverbundene Stichproben verwendet. IL-6 bewirkte zu allen drei Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung der Steroidproduktion mit $p < 0,001$ (Abb. 21).

Nach 24 h ergab sich eine basale Steroidsekretion von $0,5 \pm 0,04$ ng/ml. Interleukin-6 konnte die Steroidausschüttung nach 24 h um das 2,0-fache auf $0,9 \pm 0,1$ ng/ml steigern ($p < 0,001$). Nach einer Inkubationsdauer von 36 h bzw. 48 h konnte die Steroidsekretion durch Interleukin-6 um das 2,4-fache bzw. um das 2,9-fache von $1,37 \pm 0,1$ ng/ml auf $1,75 \pm 0,1$ ng/ml signifikant erhöht werden ($p < 0,001$). Die Basalrate lag zu den o. g. Zeitpunkten bei $0,58 \pm 0,05$ ng/ml bzw. $0,63 \pm 0,05$ ng/ml

ACTH bewirkte nach 24 h eine 5,6-fache Steigerung der Steroidproduktion auf $2,24 \pm 0,3$ ng/ml ($p < 0,001$). Nach 36 h bzw. 48 h konnte eine 4,6- bzw. 3,3-fache Erhöhung der Steroidsekretion auf $2,63 \pm 0,3$ ng/ml bzw. auf $1,96 \pm 0,1$ ng/ml ($p < 0,001$) verzeichnet werden (Abb. 21).

Zeitlicher Verlauf der Steroidsekretion durch Y-1 Zellen nach Inkubation mit IL-6

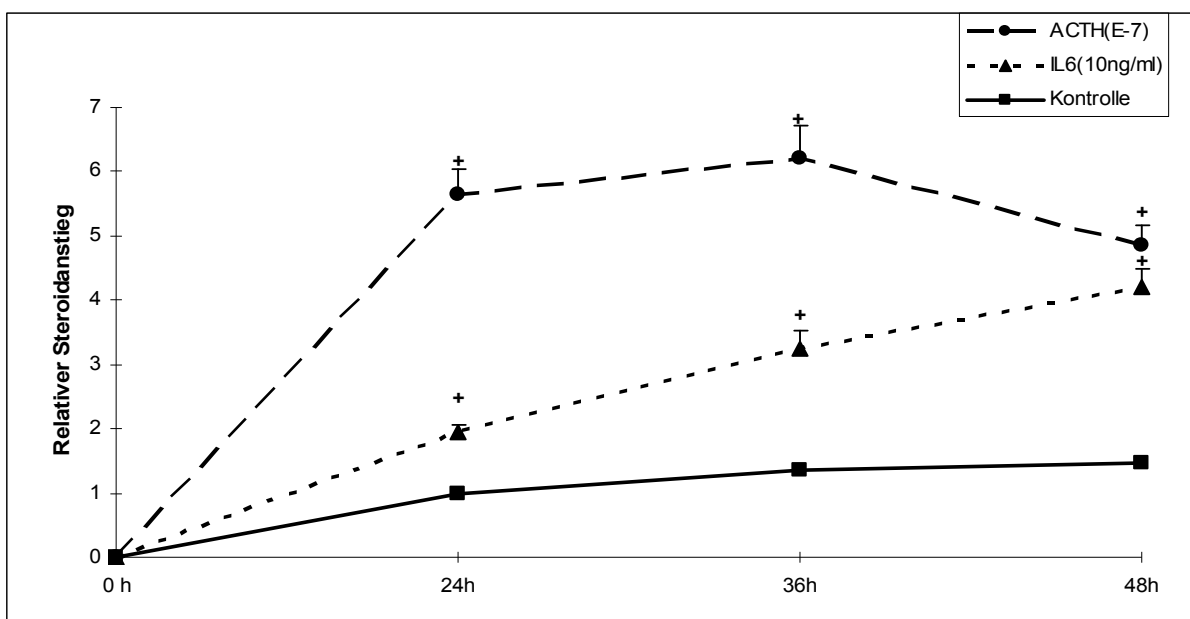


Abb. 21: Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Steroidsekretion durch Y-1 Zellen nach Inkubation mit 10 ng/ml IL-6. Ab 24 h zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Steroidsekretion mit $p < 0,001$ (+) gegenüber der Kontrollgruppe. ACTH stellte sich als sehr potenter Stimulus der Steroidsekretion dar und erreichte sein Maximum nach 36 h.

3.5 Interleukin-11 und 6 aktivieren die Jak-STAT-Kaskade in NNR-Zellen

Mit diesem Versuchsaufbau soll gezeigt werden, dass Interleukin-6 und 11 die Jak-STAT-Signalkaskade in Y-1 Zellen stimulieren.

Y-1 Zellen wurden dazu für 2, 5, 10 und 15 Minuten mit 10 ng/ml Interleukin-6 bzw. Interleukin-11 inkubiert. Aus dem Proteinlysat der behandelten Y-1 Zellen wurden phosphorylierte STAT-Proteine (STAT1, STAT3 und STAT5) mittels Western Blot Verfahren nachgewiesen. Es wurde jeweils eine Positivkontrolle für das jeweilige phosphorylierte Protein in gleicher Menge aufgetragen. Zudem wurde durch Verwendung von Antikörpern gegen die unphosphorylierten STATs gezeigt, dass gleiche Mengen an Proben aufgetragen wurden. Es wurden drei von einander unabhängige Versuche durchgeführt.

3.5.1. Interleukin-11 und 6 aktivieren p-STAT3 in murinen Y-1 NNR-Zellen

Interleukin-11 und 6 führen zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung der STAT3-Proteine (Abb. 22). Interleukin-6 bewirkt nach 2 Minuten eine sichtbare und ab 5 Minuten eine deutliche Phosphorylierung der STAT3-Proteine. Bei Interleukin-11 war ebenfalls ab zwei Minuten eine STAT3-Aktivierung zu erkennen, allerdings konnte erst nach 10-minütiger Inkubationszeit eine deutliche Stimulierung der pSTAT3-Proteine sichtbar gemacht werden; im Vergleich zu Interleukin-6 fällt diese geringer aus.

Tyrosinphosphorylierung von STAT3 in Y-1 Zellen durch Interleukin-11 und 6

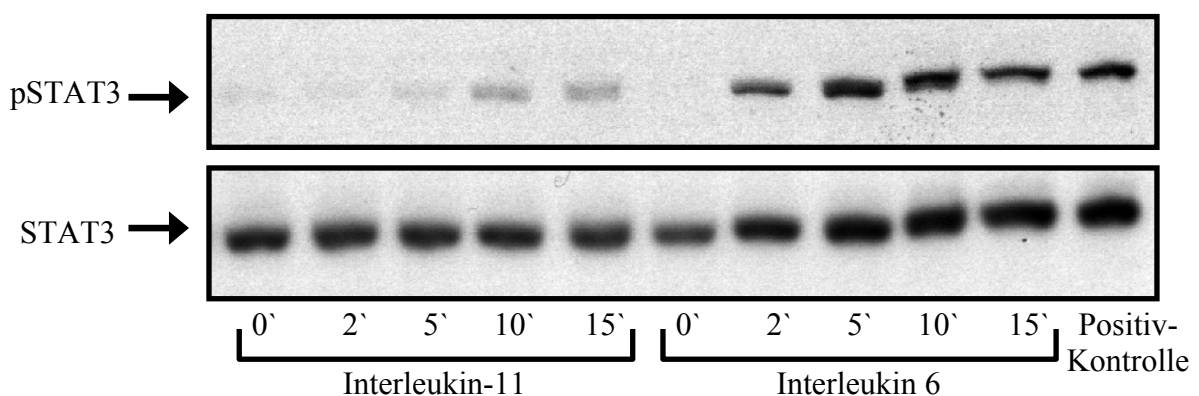


Abb. 22: Im Western Blot-Verfahren wurde mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht, dass die Inkubation von Y-1 Zellen mit Interleukin-11 und 6 (jew. 10 ng/ml) zu einer Tyrosinphosphorylierung von STAT3 führt. Ein deutlicher Anstieg der Tyrosinphosphorylierung von STAT3 ist für Interleukin-11 nach 10 Minuten und für Interleukin-6 schon ab 2 Minuten erkennbar. Durch Verwendung von Antikörpern gegen STAT3 wurde gezeigt, dass die gleiche Menge der jeweiligen Probe aufgetragen wurde.

3.5.2 Interleukin-6 aktiviert p-STAT1 in murinen Y-1 NNR-Zellen

Interleukin-6 bewirkte nach 2 Minuten eine sichtbare und nach 5 Minuten eine deutliche Phosphorylierung der STAT1-Proteine.

Dagegen zeigte Interleukin-11 keinen eindeutigen Effekt auf die STAT1-Phosphorylierung (Abb. 23).

Tyrosinphosphorylierung von STAT1 in Y-1 Zellen durch Interleukin-11 und 6

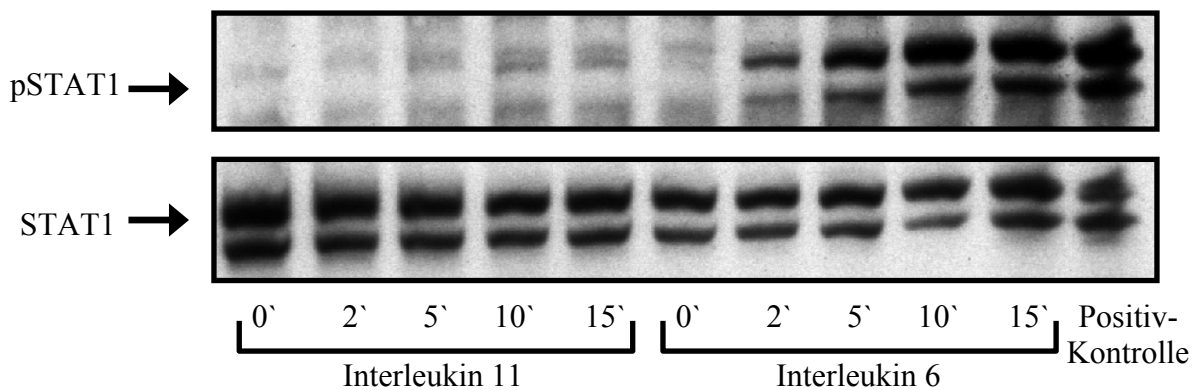


Abb. 23: Im Western Blot-Verfahren wurde mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht, dass die Inkubation von Y-1 Zellen mit Interleukin-11 und 6 (jew. 10 ng/ml) zu einer Tyrosinphosphorylierung von STAT1 (oberer Anteil der Doppelbande) führt. Hier konnte eine Zunahme von pSTAT1 durch Interleukin-6 nachgewiesen werden. Für Interleukin-11 konnte kein eindeutiger Nachweis der STAT1-Phosphorylierung erbracht werden. Durch Verwendung von Antikörpern gegen STAT1 wurde gezeigt, dass die gleiche Menge der jeweiligen Probe aufgetragen wurde.

3.5.3 Interleukin-6 aktiviert p-STAT5 in murinen Y-1 NNR-Zellen

Interleukin-6 bewirkte eine schwache STAT5-Phosphorylierung ab einer fünfminütigen Inkubationszeit. Dagegen zeigte Interleukin-11 keinen eindeutigen Effekt auf die STAT5-Phosphorylierung (Abb. 24).

Tyrosinphosphorylierung von STAT5 in Y-1 Zellen durch Interleukin-11 und 6

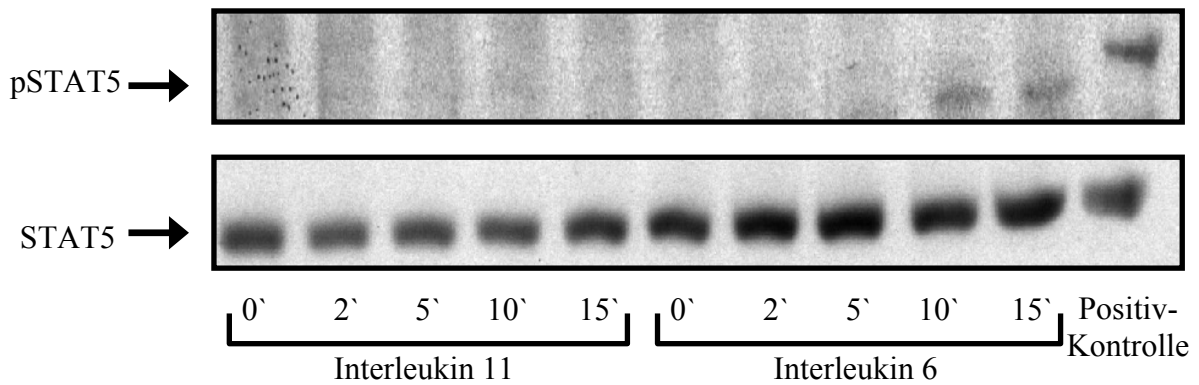


Abb. 24: Im Western Blot-Verfahren wurde mit spezifischen Antikörpern gegen pSTAT5 nachgewiesen, dass die Inkubation von Y-1 Zellen mit 10 ng/ml Interleukin-6 nach fünfminütiger Inkubationszeit zu einer Tyrosinphosphorylierung von STAT5 führt. Interleukin-11 dagegen induziert keine STAT5-Phosphorylierung. Durch Verwendung von Antikörpern gegen STAT5 wurde gezeigt, dass die gleiche Menge der jeweiligen Probe aufgetragen wurde.

3.6 Interleukin-11 und 6 aktivieren den Ras-MAP-Kinase-Signalweg

Da für viele Interleukine eine Signaltransduktion über den Ras-MAP-Kinase-Pathway bekannt ist, wurde dieser Signalweg für Interleukin-11 und 6 untersucht. Die Proteinlysate der stimulierten NNR Y-1 Zellen wurden mit anti-MAP-Kinase Antikörpern behandelt. Es handelte sich speziell um Antikörper gegen die MAP-Kinasen ERK1 und 2.

Es konnte eine zeitabhängige Aktivierung der MAP-Kinasen durch Interleukin-6 und 11 nachgewiesen werden. Da der Signalweg über die MAP-Kinasen ein häufig benutzter Signalweg ist, findet sich schon bei der Nullkontrolle eine Grundaktivität der Kinasen ERK1 und 2. Die Phosphorylierung nimmt jedoch während der Inkubation zeitabhängig deutlich zu: Interleukin-11 bewirkt nach 10 Minuten Inkubationszeit eine mäßige Aktivitätssteigerung der MAP-Kinasen, Interleukin-6 induziert schon ab einer fünfminütigen Inkubationszeit einen deutlichen Anstieg der Phosphorylierung (Abb. 25).

Phosphorylierung von ERK 1/2 in Y-1 Zellen durch Interleukin-11 und 6

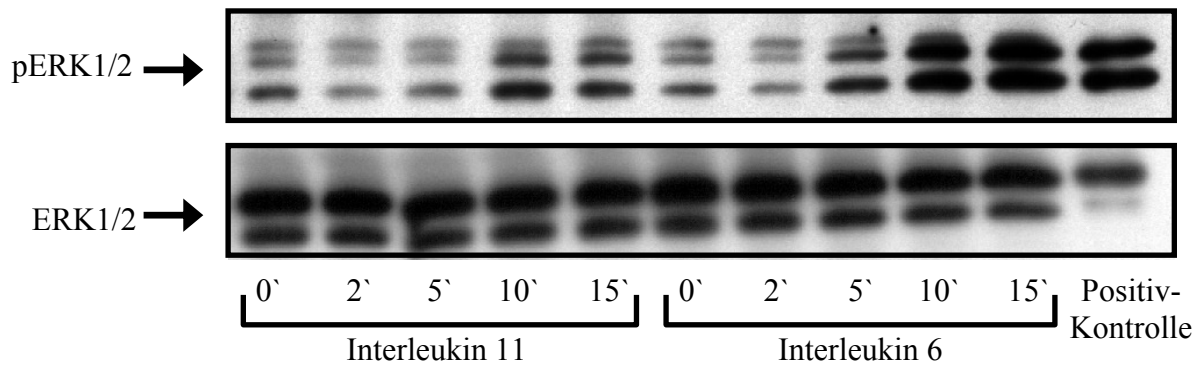


Abb. 25: Mit spezifischen Antikörpern gegen pERK1/2 wurde im Western Blot-Verfahren sichtbar gemacht, dass die Inkubation von Y-1 Zellen mit Interleukin-11 und 6 (jew. 10 ng/ml) zu einer Tyrosinphosphorylierung von ERK1/2 führt. Da der Signalweg über die Ras-MAP-Kinase ein ubiquitärer Signalweg ist, zeigte sich schon ohne Inkubation mit den Interleukinen eine gewisse Grundaktivität. Es konnte eindeutig eine zeitabhängige Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2 durch Interleukin-11 und 6 nachgewiesen werden. Interleukin-6 bewirkte schon nach 5 Minuten eine deutliche Stimulierung von pERK1/2, Interleukin-11 erst nach 10-minütiger Inkubation. Durch Verwendung von Antikörpern gegen ERK1/2 wurde nachgewiesen, dass die gleiche Menge der jeweiligen Probe aufgetragen wurde.

3.7 Aktivierung des SOCS-3 Promotors durch Interleukin-11 und 6

Mit diesem Versuch sollte nachgewiesen werden, dass Interleukin-11 und 6 über die Jak-STAT-Signalkaskade den Suppressor Of Cytokine Signaling (SOCS-3) aktivieren. Y-1 Zellen wurden mit einem „murinen -2757/+929 SOCS-3-Promotor pGL3 Luciferase Reporter Konstrukt“ (pGL3-Basic Vektor, Promega) oder mit dem Kontrollvektor pGL3-Basic transient transfiziert. Anschließend folgte eine Stimulation der transfizierten Zellen mit 10 ng/ml Interleukin-11 oder 6. Die SOCS-3 Promotor Aktivität resultierte in einer Luciferaseaktivität, messbar in „relativ light units“ (RLU).

Es wurden drei von einander unabhängige Versuche durchgeführt. Für die Statistik wurde der t-Test für unverbundene Stichproben sowohl in der Einzel- als auch der Gesamtauswertung verwendet.

Die Zellen konnten erfolgreich transfiziert werden. Dies wird sichtbar durch die unterschiedliche Grundaktivität von untransfizierten Y-1 Zellen (im Durchschnitt 132 RLU) gegenüber den mit dem pGL3-Basic-Vektor transfizierten Zellen (im Durchschnitt 198 RLU). Die Transfektion mit dem „SOCS-3 Promotor-Luciferase-Konstrukt“ bewirkte in der unstimulierten Gruppe eine Luciferaseaktivität von durchschnittlich 32.308 RLU. Die Luciferaseaktivität der „SOCS-3 unstimulierten“ Gruppe galt in den einzelnen Versuchen als Bezugsgröße und wurde somit gleich „1“ gesetzt (Abb. 26).

In den drei Gruppen der mit dem Kontrollvektor pGL3-Basic transfizierten Zellen wurde durchschnittlich eine 0,02-fache Luciferaseaktivität \pm 0,013 erreicht. Die Interleukine bewirkten keine signifikante Steigerung der Luciferaseaktivität.

Bei den mit dem „-2757/+929 SOCS-3 Promotor-Konstrukt“ transfizierten Y-1 Zellen erzielte Interleukin-11 nach 6 Stunden Inkubationszeit im Mittel eine signifikante Erhöhung der Luciferaseaktivität um das 2,8-fache (\pm 0,5) gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

Interleukin-6 bewirkte nach 6 Stunden Inkubationszeit in den SOCS-3 Promotor transfizierten Zellen im Mittel eine signifikante Zunahme der Luciferaseaktivität um das 2,5-fache (\pm 0,2) gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,01$) (Abb. 26).

SOCS3-Promotoraktivität in Y-1 Zellen durch Stimulation mit IL-11 und 6

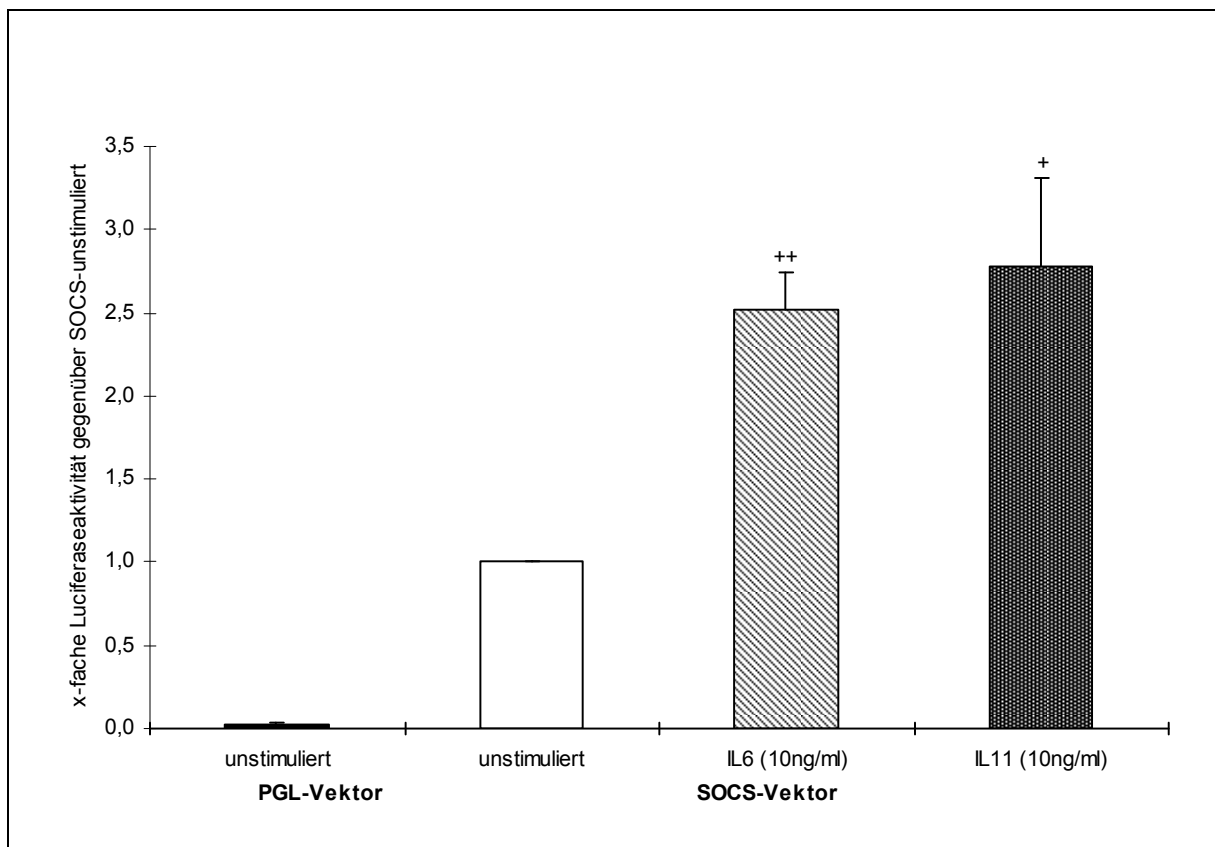


Abb. 26: Durch Transfektion der Y-1 Zellen mit einem murinen -2757/+929 SOCS-3 Promotor-Luciferase-Konstrukt und anschließender Inkubation der transfizierten Zellen mit jeweils 10 ng/ml Interleukin-6 und 11 konnte eine signifikante Steigerung der SOCS-3-Promotoraktivität gegenüber den unstimulierten transfizierten Y-1 Zellen nachgewiesen werden. Interleukin-6 zeigte eine signifikant erhöhte SOCS-3-Promotoraktivität mit $p < 0,01$ (++) gegenüber der unstimulierten Gruppe, wohingegen Interleukin-11 eine Signifikanz von $p < 0,05$ (+) erreichte.

3.8 IL-11 und 6 induzieren die Expression von mSOCS-3 in Y-1 Zellen

Mit diesem Versuch wurde nachgewiesen, dass die Expression von murinem SOCS-3 durch die Interleukine-6 und 11 gefördert wird. Dazu wurden Y-1 Zellen für 30, 60 und 90 Minuten mit 10 ng/ml Interleukin-11 bzw. 10 ng/ml Interleukin-6 inkubiert. 20 µg der gesamten mRNA wurden mittels Northern Blot analysiert. Zur Markierung der SOCS-3 mRNA wurden α^{32} -markierte DNA-Sonden verwendet. Durch Belichtung eines Radiographiefilms konnten die spezifischen Banden sichtbar gemacht werden. Die Membran wurde anschließend gestrippt und erneut mit einer murinen Beta-Aktin-Sonde behandelt. Die Dicke und Dichte der Beta-Aktin-Banden entspricht der aufgetragenen Menge an mRNA, die in allen Versuchsgruppen gleich groß sein sollte, um eine quantitative Aussage über die Menge an SOCS-3 mRNA stellen zu können.

Interleukin-11 bewirkte nach 60 Minuten einen signifikanten Anstieg der SOCS-3 mRNA gegenüber der Negativkontrolle, Interleukin-6 dagegen erreichte schon nach 30-minütiger Inkubation eine noch stärker signifikante Genexpression von SOCS-3 (Abb. 27).

Murine SOCS3-Genexpression in Y-1 Zellen durch Stimulation mit IL-11 und 6

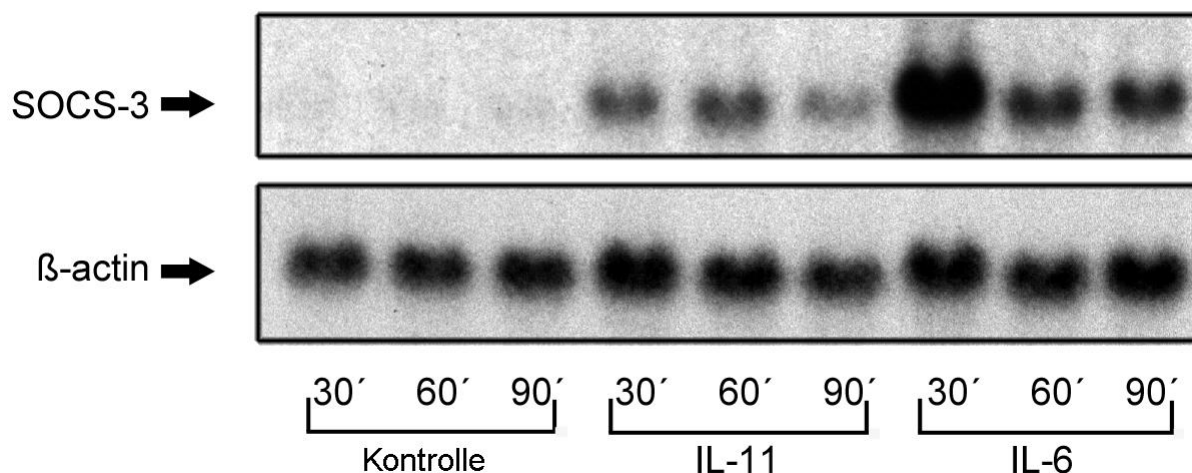


Abb. 27: Mittels Northern Blot-Verfahren konnte die murine SOCS-3-Genexpression in Y-1 Zellen nach Stimulation mit Interleukin-6 und 11 bewiesen werden. Interleukin-6 und 11 bewirkten schon nach 30-minütiger Inkubation einen Anstieg der SOCS3-Genexpression. Das Maximum lag bei Interleukin-6 bei 30 Minuten, Interleukin-11 hatte sein Maximum nach 60 Minuten Wirkungszeit. Die gestrippte Membran wurde anschließend mit einer murinen Beta-Aktin-Sonde behandelt und zeigte, dass gleiche Mengen an mRNA aufgetragen wurden. Gezeigt ist ein repräsentativer Northern Blot von $n=3$ Experimenten.

3.9 SOCS-3-Überexpression in Y-1 NNR-Zellen

Es sollte die supprimierende Wirkung von SOCS-3 auf die zytokinvermittelte Steroidsynthese durch Überexpression von SOCS-3 untersucht werden.

Hierfür wurden Y-1 Zellen mit einem durch den CMV-Promotor aktivierten pCR3.1-Topo Vektor (Invitrogen) stabil transfiziert. Dieser enthielt ein 748 bp großes, die gesamte cDNA von SOCS-3 umfassendes Fragment (GeneBank, Acc. U88328, bp15 - 762). Der Kontrollvektor entsprach dem blanden pCR3.1 Topo Vektor.

Die stabile Transfektion nach der Ca-P Methode (Current Protokolls) war erfolgreich. Mittels Nothern Blot Verfahren konnte bewiesen werden, dass eine erfolgreiche Transfektion der SOCS3-mRNA in polyklonalen SOCS-3 transfizierten Zellen (S-Klone) stattgefunden hatte. In den polyklonalen Kontrollvektor transfizierten Zellen (N-Klone) konnte wie erwartet keine erhöhte Menge an SOCS-3-mRNA nachgewiesen werden. In den S-Klonen ist die mSOCS-3 Genexpression um ein Vielfaches stärker ausgeprägt, als in den N-Klonen (Abb. 28).

Stabile Transfektion von muriner SOCS-3-mRNA in Y-1 Zellen

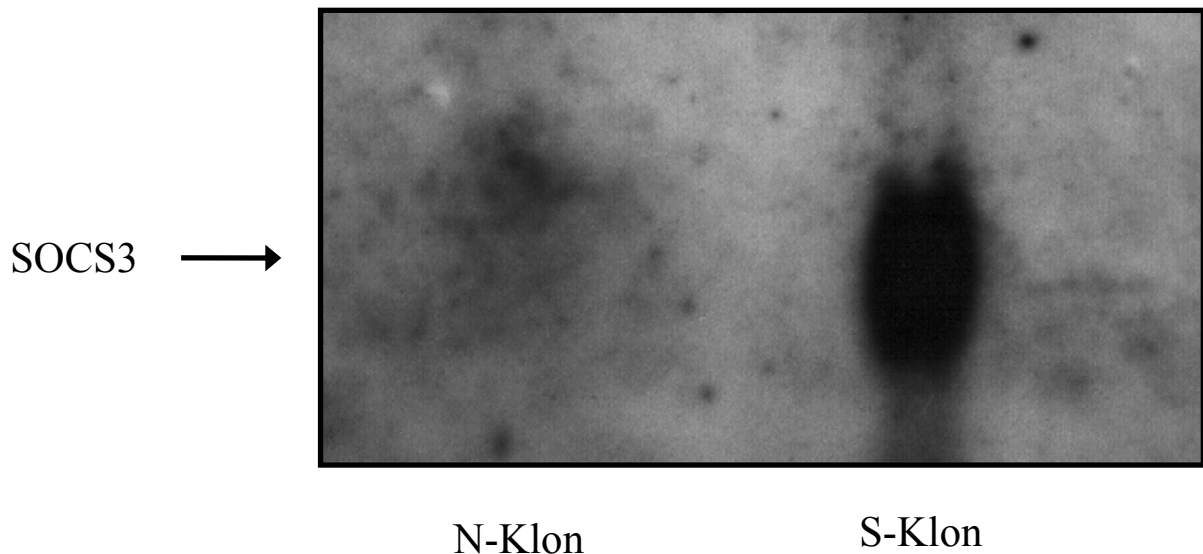


Abb. 28: Y-1 Zellen wurden mittels Ca-P-Transfektion stabil mit einem 748 bp großem murinem SOCS-3 Fragment transfiziert. Dies konnte mittels Nothern Blot-Verfahren in den polyklonalen SOCS-3-transfizierten S-Klonen nachgewiesen werden. In den polyklonal Kontrollvektor-transfizierten N-Klonen zeigte sich nur ein minimaler Anteil von SOCS-3-mRNA. Im weiteren Verlauf wurden einzelne S- und N-Klone über einen Zeitraum von mehreren Wochen in G418-haltigem Medium gezüchtet.

Einzelne S- und N-Klone wurden einer Stimulation mit ACTH und Interleukin-6 für 24 h, 36 h und 48 h unterzogen. Anschließend wurde die Steroidproduktion mittels Radioimmunoassay bestimmt.

Leider mussten wir feststellen, dass sowohl die N-Klone als auch die S-Klone kein Steroid mehr produzierten. Die Y-1 Zellen waren wahrscheinlich durch die Transfektion per se so in ihrem Genom verändert worden, dass keine Steroidsynthese mehr möglich war.

4. Diskussion

Nachweis des gp130- und IL-11-R in Y-1 Zellen und muriner Nebennierenrinde

Für viele Zytokine der Interleukin-6-Familie ist eine immunmodulatorische Wirkung auf die HHN-Achse bekannt. Für Interleukin-6 wurde dieser Nachweis sowohl auf Hypothalamus- und Hypophysenebene gezeigt wie auch auf der Ebene der Nebennierenrinde (Bornstein et al., 2004; Judd et al., 2000; Mastorakos et al., 1993; Muramami et al., 1993; Ray and Melmed, 1997).

Für Interleukin-11 ist bisher nur eine immunmodulatorische Funktion an der Hypophyse bekannt (Auernhammer and Melmed, 1999).

In der Annahme, dass IL-11 ebenso eine modulatorische Funktion an der Nebennierenrinde wie an der Hypophyse hat, wollten wir zunächst den Rezeptorkomplex für IL-11 an Nebennierenrindenzellen nachweisen. Der Interleukin-11-Rezeptorkomplex ist ein Hexamer bestehend aus je zwei Molekülen Interleukin-11, Interleukin-11-R α und gp130-R (Abb. 29) (Barton et al., 2000). Wir konnten mittels RT-PCR und anschließender Restriktion zum ersten Mal zeigen, dass sowohl primäre Nebennierenrindenzellen von C57BL/6 Mäusen als auch die kortikoide murine Y-1 Zelllinie den murinen IL-11-Rezeptor exprimieren (Abb. 15). Dazu haben wir einen Primer verwendet, der beide Isoformen des IL-11-R α kodiert (Abb. 13). Somit können wir zwar keine Aussage darüber machen, welcher der beiden Rezeptoren auf den murinen Nebennierenrindenzellen vorkommt. Es ist jedoch für den Nachweis der IL-11-Funktion an der Nebennierenrinde nicht essentiell, welcher der beiden Isoformen auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Lebeau et al konnten durch Transfektionsstudien nachweisen, dass für beide Isoformen kein Unterschied in der Bindung an den gp130-Rezeptor und in der nachfolgenden Signaltransduktion besteht (Lebeau et al., 1997). Genauso wie der IL-11-R α 2 besitzt auch der lösliche IL-11-R keinen intrazellulären Anteil, zusätzlich fehlt ihm allerdings auch noch der transmembranöse Rezeptoranteil. Auch Studien über die lösliche Form des IL-11-R α zeigen keinen Unterschied in der Affinität zum IL-11 oder gp130-Molekül (Curtis et al., 1997; Neddermann et al., 1996). Baumann et al. hatten in Hepatomzellen, embryonalen Karzinomzellen und T-Lymphozyten gezeigt, dass Interleukin-11 in Kombination mit einem löslichen IL-11-R in Zellen, welche keinen membrangebundenen IL-11-R α besitzen, die typische Signalkaskade der Interleukin-6-Familie aktiviert. Der lösliche IL-11-Rezeptor kann genauso wie der lösliche IL-6-Rezeptor die für das jeweilige Interleukin typische

et al. (2000) konnte allerdings an Hand der Stereometrie des Interleukin-11 und seinen Bindungsstellen nachweisen, dass im Grunde genommen nur die Form eines Hexamers für den Interleukin-11-Rezeptorkomplex in Frage kommt. Mit Hilfe von mehreren Rezeptorstudien über Stöchiometrie und Rezeptor-Liganden-Kompositionen wurde die Theorie der Bildung eines Hexamers für Interleukin-11 weiter erhärtet (Bravo and Heath, 2000). Bewiesen ist, dass Interleukin-6 mit seinem Interleukin-6-R und dem gp130-Molekül ein Hexamer bildet, über den die Signalkaskade erst aktiviert werden kann. Der Interleukin-6-R α weist sowohl in seiner Aminosäurestruktur als auch in seiner geometrischen Form eine hohe Ähnlichkeit mit dem Interleukin-11-R α auf (Du and Williams, 1997), so dass die Wahrscheinlichkeit sehr hoch ist, dass auch der Interleukin-11-Rezeptorkomplex ein Hexamer ist (Abb. 4).

Produktionsorte von Interleukin-11

Interleukin-11 konnte bisher im Thymus, in der Milz und im Knochenmark nachgewiesen werden, ebenso wird es im Herz, in der Lunge, im Dünn- und Dickdarm und der Niere sowie im Gehirn, dem Hoden und den Ovarien produziert. (Davidson et al., 1997; Du et al., 1996). Die Produktion von Interleukin-11 im Hippocampus, dem Hypothalamus und der Hypophyse ist ebenfalls bewiesen (Auernhammer and Melmed, 1999; Du et al., 1996).

Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen war es, herauszufinden, ob Interleukin-11 auch von den Nebennierenrindenzellen produziert wird und somit parakrin bzw. autokrin auf die adrenale Steroidsynthese wirken kann.

Wir konnten zum ersten Mal den Nachweis erbringen, dass Interleukin-11 in unstimulierten Nebennierenrindenzellen exprimiert wird. Mittels RT-PCR konnte eine geringe Expression von Interleukin-11 in den murinen adrenokortikalen Tumorzellen Y-1 und im Nebennierenrindengewebe von C57BL/6 Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 16). Der Expressionslevel für Interleukin-11-mRNA ist jedoch bisher auch in anderen Geweben eher gering gewesen (Davidson et al., 1997; Du et al., 1996; Morris et al., 1996), so dass unser Ergebnis mit den bisherigen Erkenntnissen konform geht.

Interleukin-11 kann demnach autokrin/parakrin an der Nebennierenrinde wirken. In welcher Weise Interleukin-11 auf die Nebennierenrinde wirkt, haben wir im Weiteren untersucht.

Interleukin-11 induziert die Steroidsekretion an der Nebennierenrindenzelle Y-1

Wir konnten zum ersten Mal Effekte von Interleukin-11 auf die adrenale Steroidsynthese an der murinen NNR-Zelllinie Y-1 nachweisen.

Y-1 Zellen können wegen eines Defektes der CYP21-Hydroxylase kein Corticosteron produzieren, sondern nur Steroidvorstufen wie 20α -Dihydroxy-Progesteron und 11β - 20α -Dihydroxy-Progesteron (Abb. 12) synthetisieren und sezernieren (Rainey et al., 2004). Die in unserem Assay gemessenen „Corticosteron-Konzentrationen“ entsprechen somit am ehesten nicht näher definierbaren Steroidvorstufen. Es lässt sich dadurch in der vorliegenden Arbeit nur allgemein die „Steroidsynthese“ semiquantitativ erfassen.

Interleukin-11 induzierte eine dosisabhängige Steroidproduktion im murinen Zellkultursystem (Abb. 17). Die Ergebnisse zeigten ab einer Inkubationsmenge von 5 ng/ml IL-11 eine signifikante Steroidsekretion gegenüber der Negativkontrolle.

Wir konnten weiterhin eine zeitabhängige Wirkung von Interleukin-11 an der murinen adrenokortikalen Y-1 Zelle aufdecken (Abb. 18). Nach 24 h ergab sich für Interleukin-11 verglichen mit der Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg der Steroidsekretion auf das 1,3-fache (vgl. Positivkontrolle ACTH: 6,8-facher Anstieg). Zu den Zeitpunkten 36 h und 48 h zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe mit 1,50- bzw. 1,55-fachen Anstiegen (vgl. Positivkontrolle ACTH 5,9- bzw. 4,8-facher Anstieg).

ACTH und IL-11 wirken nicht synergistisch oder additiv an der Nebennierenrinde

Eine gleichzeitige Inkubation von 10^{-7} M ACTH und 10 ng/ml IL-11 bewirkte zu keinem Zeitpunkt von 24 h bis 48 h eine signifikante Erhöhung der Steroidproduktion gegenüber der alleinigen Inkubation mit ACTH (Abb. 19). Somit kann weder von einem synergistischen noch von einem additiven Effekt ausgegangen werden.

Eventuell könnte ein synergistischer Effekt durch Inkubation mit ACTH in einer niedrigeren submaximalen Konzentration beobachtet werden. Dies wurde jedoch nicht untersucht.

Interleukin-6 induziert die Steroidsekretion an der Nebennierenrindenzelle Y-1

Für Interleukin-6 ist eine aktivierende Wirkung am Hypothalamus und an der Hypophyse beschrieben worden, Interleukin-6 führt zu einer erhöhten Ausschüttung von ACTH (Besedovsky and del Rey, 1996; Ray and Melmed, 1997).

Eine direkte die NNR stimulierende Funktion von Interleukin-6 ist sowohl für den Menschen als auch die Ratte beschrieben worden (Franchimont et al., 2000; Mastorakos et al., 1993). Interleukin-6 hat eine direkte Wirkung auf die Nebennierenrinde und führt zur Produktion von humanem Cortisol bzw. murinem Corticosteron. Interleukin-6 ist unter den Zytokinen einer der Hauptaktivatoren an der Nebennierenrinde. Aus diesem Grund wurde Interleukin-6 als Vergleichsparameter für die Versuche über die Steroidproduktion der murinen Y-1 Zellen verwendet.

Zu allen untersuchten Zeitpunkten (24 h, 36 h, 48 h) bewirkte eine Menge von 10 ng/ml Interleukin-6 eine signifikante dosis- und zeitabhängige Stimulation der Steroidproduktion im Zellkultursystem von murinen Nebennierenrinden Y-1 Zellen (Abb. 20 und 21).

Um eine zeitabhängige Wirkung von Interleukin-6 nachweisen zu können, wurden Y-1 Zellen von 24 h bis 48 h mit der getesteten Dosis von 10 ng/ml Interleukin-6 inkubiert (Abb. 21).

Es zeigte sich im Vergleich eine deutlich potentere Stimulation der adrenalen Steroidsynthese durch Interleukin-6 gegenüber Interleukin-11.

Interleukin-11 und 6 aktivieren die Jak-STAT-Kaskade in murinen Y-1 Zellen

Es ist bekannt, dass die Zytokine der Interleukin-6-Familie über den gp130-Rezeptor die Jak-STAT-Kaskade aktivieren und damit zur Signaltransduktion führen (Cooney, 2002; Imada and Leonard, 2000; O'Shea et al., 2002).

Für Zytokine, die den gp130-Rezeptor zur Signaltransduktion benutzen, ist STAT 3 (Signaling Transducers and Activators of Transcription) der potenteste der sieben bekannten Transkriptionsfaktoren (Akira et al., 1994; Zhong et al., 1994). In einigen Fällen wird auch eine Aktivierung von STAT1 beschrieben (Boulton et al., 1995), die jedoch meist in niedriger Konzentration ausfällt und einen stärkeren Stimulus, z.B. durch höhere Konzentrationen an Interleukin-6, benötigt (Zhong et al., 1994). Auch für Interleukin-11 ist die Aktivierung von STAT1 und STAT3 beschrieben worden (Dahmen et al., 1998).

Bestimmt wird das Zusammenspiel von Jaks und STATs durch die Box 1 – und Box 2 - Region des intrazellulären Anteils des signaltransduzierenden Rezeptors, hier der gp130-Rezeptor (Taga and Kishimoto, 1997). Eine Tyrosinphosphorylierung der Box 1 ist verantwortlich für die Bindung von Januskinasen (JAK 1,2 und TYK2), die wiederum zur Phosphorylierung von Tyrosinresten der Box 2-Region führen und damit festlegen, welche STAT-Moleküle an den Rezeptor binden können (Abb. 30) (Heinrich et al., 2003; Taga, 1997).

STAT1 und STAT3 können sowohl Homodimere als auch Heterodimere bilden (Abb. 30). Nur als Dimere sind die STATs aktiviert. Sie gelangen auf noch ungeklärtem Weg in den Nukleolus und bewirken dort eine Transkription der Zielgene. Für den endonukleären Transport sind bis jetzt verschiedene Theorien aufgestellt worden: Möglich ist eine rezeptorabhängige Endozytose in den Nukleolus, wie sie für STAT3 nachgewiesen wurde (Bild et al., 2002). Weiterhin kann ein Ran-abhängiger aktiver Transport in den Zellkern stattfinden, dies konnte für STAT1 bewiesen werden (Sekimoto et al., 1997). Mitbeteiligt am Transport ist wahrscheinlich die NLS (nuclear-localisation-sequenz). Diese konnte jedoch bisher nur bei STAT1 und STAT5 nachgewiesen werden (Herrington et al., 1999; McBride et

al., 2002). Eventuell besteht auch ein kontinuierlicher Import und Export der STATs zwischen Zytosol und Zellkern (Heinrich et al., 2003).

Signaltransduktion über den Jak-STAT-Pathway

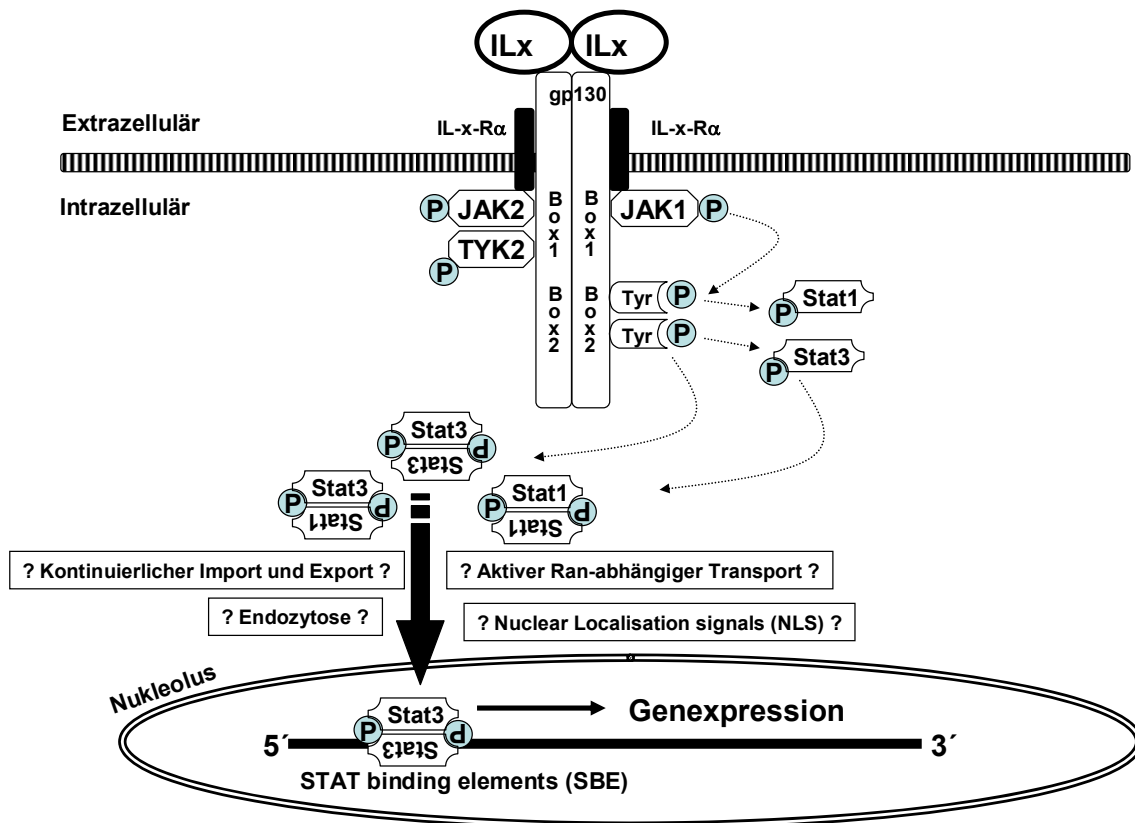


Abb. 30: Die Signaltransduktion der Interleukin-6-Familie läuft über den signaltransduktionsfähigen Rezeptorkomplex bestehend aus zwei Molekülen Interleukin-x, zwei Molekülen des spezifischen Interleukin-x-Rezeptors und meistens zwei Molekülen des gp130-Rezeptors. An der Box1-Region des intrazellulären gp130-Rezeptors sind ständig assoziiert Januskinasen, hier speziell JAK1, 2 und TYK2. Diese werden durch die Dimerisation von zwei gp130-Molekülen autophosphoryliert und bewirken dadurch eine Phosphorylierung von Tyrosinresten in der Box2-Region des gp130-Rezeptors. An diese speziellen phosphorylierten Tyrosinreste binden nun die STAT1 und STAT3. Die dadurch phosphorylierten STATs sind nun aktiviert und gehen Homo- bzw. Heterodimere mit anderen STAT-Molekülen ein. Auf noch ungeklärtem Wege gelangen die STAT-Dimere in den Nukleolus und binden an sog. SBE der DNA (STAT-binding elements), um die entsprechende Genexpression zu initiieren. (Eigene Abbildung)

Wir konnten beweisen, dass die Interleukine-6 und 11 auch in der Nebennierenrindenzelle über den Jak-STAT-Pathway agieren. Dazu haben wir den aktivierten und phosphorylierten Zustand der STAT-Moleküle in den Y-1 Zellen nachgewiesen, nachdem sie mit Interleukin-6 bzw. Interleukin-11 stimuliert worden waren. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen, die Positivkontrolle war ein Proteinlysate mit hohen Mengen an phosphoryliertem STAT-Molekülen.

Wir konnten mittels Western Blot nachweisen, dass Interleukin-6 schon nach zwei Minuten eine deutlich sichtbare Phosphorylierung von STAT3 in den Y-1 Zellen verursacht. Die Menge an phosphoryliertem STAT3 nimmt bis zu einer Inkubationszeit von 15 Minuten zeitabhängig zu (Abb. 22). Dies geht konform mit den Ergebnissen von Zhang et al, die mit indirekter Immunofluoreszenz nachgewiesen haben, dass sich nach einer Behandlung mit Interleukin-6 wenige Minuten später alle STAT1- und STAT3-Moleküle im Zellkern in einem aktivierten Zustand befanden. Vor der Behandlung mit Interleukin-6 waren sie sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu finden. Ca. 2 h nach der Stimulation mit Interleukin-6 herrschte wieder der Ausgangszustand (Zhang et al, 1999). Dahmen et al zeigte ebenfalls eine zeitabhängige Zunahme der Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 in 2ITGH-Zellen mit einem Peak nach 30 Minuten Inkubation mit Interleukin-6 oder 11 (Dahmen et al., 1998).

Die Aktivierung von pSTAT1 konnten wir fünf Minuten nach Stimulation mit Interleukin-6 nachweisen. Auch hier nimmt die Menge an pSTAT1 bis zu 15 Minuten nach Inkubationsbeginn zu (Abb. 23). Das Ergebnis stimmt überein mit den Resultaten von Trepicchio und Dorner (1998a), die in peritonealen Makrophagen nach Stimulation mit Interleukin-6 pSTAT3 und pSTAT1 nachweisen konnten.

Wir konnten auch für Interleukin-11 erstmals den postulierten Signalweg über die Jak-STAT-Kaskade in murinen Nebennierenrindenzellen beweisen. Ebenfalls mittels Western Blot konnten wir pSTAT3 fünf bis 15 Minuten nach Inkubation mit Interleukin-11 nachweisen (Abb. 22). Ebenso wie Trepicchio und Dorner haben wir keine Phosphorylierung von STAT1 durch Stimulation mit Interleukin-11 nachweisen können (Abb. 23). In corticotrophen AtT20-Zellen konnte weder für Interleukin-6 noch für Interleukin-11 eine Phosphorylierung von STAT1 gefunden werden, beide Interleukine bewirkten jedoch eine STAT3-Phosphorylierung (Auernhammer, Kopp et al, 2004).

Das bedeutet jedoch nicht, dass eine Phosphorylierung von STAT1 durch Interleukin-11 nicht generell möglich wäre. Dahmen et al konnten in Fibrosarkomzellen sowohl eine STAT3- als auch eine STAT1-Aktivierung durch Interleukin-11 feststellen (Dahmen et al., 1998). Er belegte auch eine Homo- bzw. Heterodimerisation von STAT3-STAT3, STAT1-STAT1 bzw. STAT3-STAT1 durch die Interleukine-6 und 11.

Insgesamt ist jedoch auch bei der Aktivierung der Jak-STAT-Kaskade an murinen NNR-Zellen festzustellen, dass Interleukin-6 der potentere Stimulus im Vergleich zu Interleukin-11 ist.

Es scheint wohl ein komplexes Zusammenspiel von Rezeptor, Zytokin und Zielgewebe zu sein, wann welche STAT-Moleküle zur Signaltransduktion eingesetzt werden. Welche

Auswirkungen die unterschiedlichen STATs auf die Genexpression haben bzw. ob jedes der STAT-Moleküle eine bestimmte Funktion übernimmt, ist noch Gegenstand derzeitiger Forschung. Interessant ist das Ergebnis von O'Shea, dass STAT1 und 3 in manchen Geweben gleichzeitig und damit als Gegenspieler (STAT3 fördert das Zellwachstum, STAT1 hemmt es) vorkommen. Vor allem im Tumorgewebe scheint jedoch dieses Gleichgewicht außer Kontrolle gekommen zu sein (O'Shea et al., 2002). Eventuell ist dies eine Erklärung dafür, dass STAT1 in der Tumorzelle Y-1 nicht vorhanden ist oder auch nur in zu geringer Menge, um es aufdecken zu können.

Interleukin-11 und 6 benutzen den Ras-Map-Kinase Pathway in murinen Y-1 Zellen

Es ist bekannt, dass die Zytokine der Interleukin-6-Familie auch über den Ras-MAP-Kinase Pathway (Abb. 10) Informationen übermitteln (Heinrich et al., 2003).

Die Ras-induzierte Signalkaskade endet letztendlich mit der Aktivierung der Mitogen Activated Protein Kinasen (MAPK): Erk1/2, p38 und JNK. Die MAP-Kinasen gelangen in den Nukleolus und führen über Transkriptionsfaktoren zur Transkription der Zielgene. (Arzt, 2001; Auernhammer and Melmed, 2000; Du and Williams, 1997; Gomez-Lechon, 1999).

Wir konnten erstmals nachweisen, dass Interleukin-6 und 11 neben der Jak-STAT-Kaskade auch den Ras-MAP-Kinase Pathway benutzen. Da dieser Pathway zellspezifisch und ubiquitär benutzbar ist, zeigte sich schon ohne Stimulation mit den Interleukinen eine geringe Grundaktivität der Kinasen Erk 1 und 2. Interleukin-6 und 11 bewirkten allerdings eine zeitabhängige Zunahme der Phosphorylierung. Nach der Stimulation mit Interleukin-6 konnte schon ab fünf Minuten eine sichtbare Aktivierung von Erk1/2 nachgewiesen werden, Interleukin-11 bewirkte dies erst ab zehn Minuten Inkubationszeit (Abb. 24).

Interleukin-11 und 6 induzieren die Genexpression von SOCS3

Die Expression der Jak-STAT-abhängigen Zielgene, welche durch Interleukine induziert werden, wird durch so genannte Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) negativ reguliert. Die über die Jak-STAT-Kaskade aktivierten STAT-Proteine bewirken neben der Genexpression der Zielgene auch eine vermehrte Bildung von SOCS-Proteinen. Auf der Promotorregion der SOCS-mRNA gibt es so genannte STAT-binding sequences, deren Aktivierung durch STAT-Proteine zu einer Expression der SOCS-mRNA führt (Larsen and Ropke, 2002). So spielt eine „STAT1/STAT3-binding sequence“ in der Promotorregion von SOCS3 eine ausschlaggebende Rolle für die SOCS3-Genexpression (Auernhammer et al., 1999). Für SOCS3 ist eine STAT-abhängige Aktivierung belegt (Starr et al., 1997).

Die Interleukine der gp130-Rezeptor Familie verwenden teilweise unterschiedliche SOCS-Proteine zur Feedbackhemmung, es scheint jedoch, dass vor allem SOCS1 und SOCS3 aktiviert werden. In der Hypophyse und im Hypothalamus wird SOCS3 durch LIF (Auernhammer et al., 1998a), Interleukin-11 (Auernhammer and Melmed, 1999) und Interleukin-6 (Gautron et al., 2003) induziert. Analog wollten wir untersuchen, ob Interleukin-11 und -6 die SOCS3-Genexpression auch in der Nebennierenrinde stimulieren.

Wir konnten zum ersten Mal nachweisen, dass Interleukin-6 und Interleukin-11 in Y-1-Nebennierenrindenzellen zu einer vermehrten Genexpression von SOCS3 führen. In einer ersten Versuchsreihe haben wir mit einem Luciferase-Assay bewiesen, dass IL-6 und IL-11 zu einer Induktion der SOCS3-Promotorregion in transient transfizierten Y-1 Zellen führen. Dazu wurde ein pGL3 Luciferase Reporter Vektor mit eingebauter SOCS3-Promotorregion verwendet. Die Induktion der SOCS3-Promotorregion durch Interleukin-6-Stimulation konnte bewiesen werden, indem es nach sechsständiger IL-6-Inkubation der Y-1 Zellen zu einer signifikant ($p < 0,05$) erhöhten Luciferase-Aktivität kam. Interleukin-6 bewirkte einen 2,5-fachen Anstieg der Luciferaseaktivität gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 26). Für Interleukin-11 konnte zum ersten Mal eine SOCS3-Induktion in Nebennierenrindenzellen nachgewiesen werden (Abb. 26). Auch hier kam es zu einer signifikanten ($p < 0,01$) Erhöhung der Luciferaseaktivität mit einem 2,8-fachen Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe. Es zeigte sich hier zwar eine tendenziell stärkere Aktivierung des SOCS3-Promotors durch Interleukin-11, diese war jedoch gegenüber Interleukin-6 nicht signifikant erhöht.

Die Ergebnisse stimmen mit den Resultaten überein, dass die beiden Interleukine der gp130-Rezeptorfamilie über die Induktion von SOCS3 zu einer Regulierung ihrer eigenen Signalkaskade führen. Dass diese Regulierung auch hier durch STAT-Bindung an die „STAT-binding-sequences“ der Promotorregion induziert wird, ist anzunehmen. Magrangeas et al. konnte eindrucksvoll nachweisen, dass Interleukin-11 in seiner Wirkung durch eine STAT3-Induktion gehemmt werden kann. Die STAT3-Induktion wurde in den Versuchsreihen von Magrangeas et al. durch Interleukin-3 initiiert. Dieser Effekt korrelierte mit der SOCS3-Expression in den Pro-B-Lymphozyten. In der Schlussfolgerung bedeutete eine STAT3-induzierte SOCS3-Genexpression, dass der Effekt von Interleukin-11 kommt (Magrangeas et al., 2001).

Für SOCS3 ist eine Aktivierung durch STAT1 und 3 beschrieben worden (Auernhammer et al., 1999; Larsen and Ropke, 2002). Nach unseren vorherigen Ergebnissen scheint in der Nebennierenrinde vor allem STAT3 daran beteiligt zu sein, eine SOCS3-Genexpression zu

bewirken, denn STAT1 scheint einen sehr potenten Stimulus zu benötigen, um in einer ausreichend hohen Konzentration aktiviert zu werden (Abb. 22 und 23).

Neben der Aktivierung der Promotorregion von SOCS3 haben wir mittels Northern Blot auch den Nachweis der SOCS3-mRNA in stimulierten Y-1 Zellen erbringen können. Interleukin-6 führte nach 30-minütiger Inkubation zu einem signifikant erhöhten Anstieg der SOCS3-mRNA. Dagegen erreichte Interleukin-11 erst nach 60-minütiger Inkubationszeit eine gesteigerte SOCS3-mRNA-Bildung (Abb. 27). Die Ergebnisse der hier beobachteten Zeitwirkung decken sich mit Forschungsergebnissen an Leberzellen (Starr et al., 1997; Yang et al., 2005) und Hypophysenzellen (Auernhammer and Melmed, 1999).

Das erste Mal konnte die Signalkaskade über gp130-R, Jak, STATs (STAT1 und 3) und SOCS3 durch Interleukin-6 und Interleukin-11 an der Nebennierenrindenzelle bewiesen werden (Abb. 31). Gezeigt haben wir auch, dass Interleukin-6 der potentere Stimulus gegenüber Interleukin-11 ist. Jedoch ist hiermit erstmalig Interleukin-11 als Mediator der Akuten-Phase-Reaktion sowohl auf der Ebene von Hypothalamus und Hypophyse als auch auf Ebene der Nebennierenrinde als End- und Zielorgan zur Steroidproduktion beschrieben worden.

Hemmung der Jak-STAT-Kaskade durch SOCS3

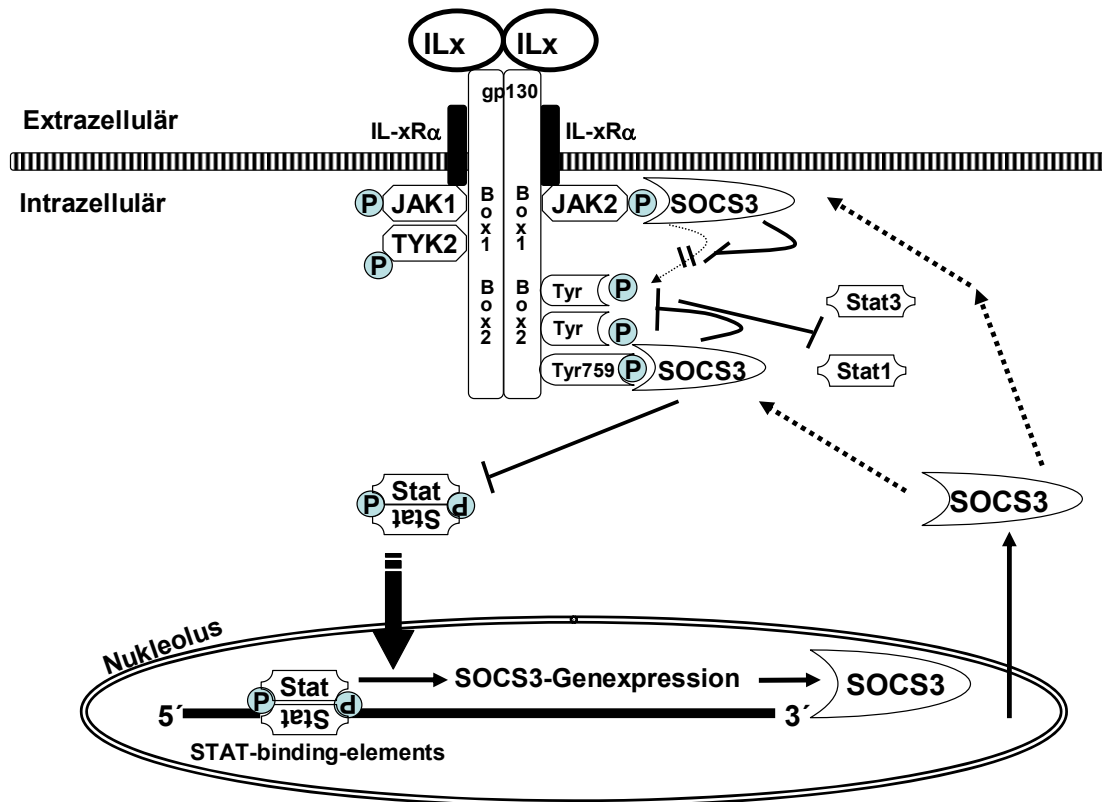


Abb. 31: Die zytokinvermittelte Signaltransduktion von Interleukin-6 und 11 führt u.a. zur Bindung der STAT-Dimere an sog. STAT-binding-elements in der Promotorregion des SOCS3-Gens. Die SOCS3-Genexpression wird initiiert. SOCS3 gelangt ins Zytosol und führt nun zu einer Feedbackhemmung der Signalkaskade. Es kann direkt an die Januskinasen (JAK2) binden und deren Phosphorylierung verhindern. Dadurch können die Tyrosinreste der Box2-Region nicht mehr für die STAT-Bindung aktiviert werden. Zudem bindet SOCS3 mit einer sehr hohen Affinität direkt an den gp130-Rezeptor (über Tyr759) und hemmt dadurch die Phosphorylierung der Box2 sowie die Bindung der STAT-Moleküle an den gp130-Rezeptor. (Eigene Abbildung)

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden an dem Zellkultursystem der murinen Nebennierenrinden-Tumorzelle Y-1 die Effekte von Interleukin-11 auf die adrenale Zellfunktion und Steroidsynthese zum ersten Mal nachgewiesen. Die intrazellulären Signalwege von Interleukin-6 und 11 an der murinen Nebennierenrindenzelle konnten erstmalig beschrieben werden.

Für Interleukin-11 konnte mittels RT-PCR sowohl der gp130-Rezeptor als auch der spezifische IL-11-Rezeptor α in murinen Y-1 Zellen nachgewiesen werden. Eine Voraussetzung dafür, dass Interleukin-11 über den klassischen Signalweg der gp130-Zytokine wirken kann. Weiterhin konnte mittels RT-PCR und anschließender Sequenzierung murine Interleukin-11-mRNA in den Y-1 Zellen detektiert werden, so dass dies die Vermutung nahe legt, dass Interleukin-11 an der Nebennierenrinde parakrin und autokrin wirken kann.

Es konnte eine dosis- und zeitabhängige Stimulation der Steroidsynthese durch Interleukin-11 nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Interleukin-6 ist Interleukin-11 ein weniger potenter Stimulus der adrenokortikalen Zelle.

Interleukin-6 und 11 benutzen in der Nebennierenrindenzelle beide den Jak-STAT-Pathway. Dies konnten wir durch vermehrte STAT-Phosphorylierung nach Stimulation mit beiden Interleukinen belegen. Interleukin-11 benutzte STAT3 zur Signaltransduktion, wohingegen Interleukin-6 STAT1 und STAT3 aktivierte. Interleukin-11 schien insgesamt eine geringere Aktivierung der STAT-Proteine zu bewirken.

Weiterhin konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass Interleukin-6 und Interleukin-11 in der Nebennierenrindenzelle zudem den Signalweg über die Aktivierung des Ras-Map-Kinase Pathway benutzen.

Mit der transienten Transfektion eines SOCS3-Promotor-Konstruktes konnte eine vermehrte Luciferaseaktivität als Hinweis auf eine erhöhte Transkription des SOCS3-Promotors durch Interleukin-11 und Interleukin-6 nachgewiesen werden. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Wirkung von Interleukin-11 und Interleukin-6. Beide Interleukine bewirkten nicht nur eine Transkription des SOCS3-Promotorgens, sondern sie induzierten auch die Bildung von SOCS3-mRNA.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass wir mit dieser Arbeit die Funktion von Interleukin-11 als Mediator der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse weiter klassifiziert haben. Interleukin-11 kann als indirekter Mediator über die Stimulierung von ACTH in der Hypophyse (Auernhammer and Melmed, 1999) und als direkter Aktivator der Nebennierenrinde (Ergebnisse dieser Arbeit) auf die Steroidsynthese einwirken. Durch die

Redundanz der verschiedenen gp130-Zytokine und die pleiotrope Wirkung der einzelnen Zytokine an unterschiedlichen Angriffspunkten ergibt sich ein komplexes immunmodulatorisches Netzwerk der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Faktoren, welches die Stressantwort des Organismus zu modulieren vermag.

Interleukinvermittelte Signaltransduktion und -hemmung

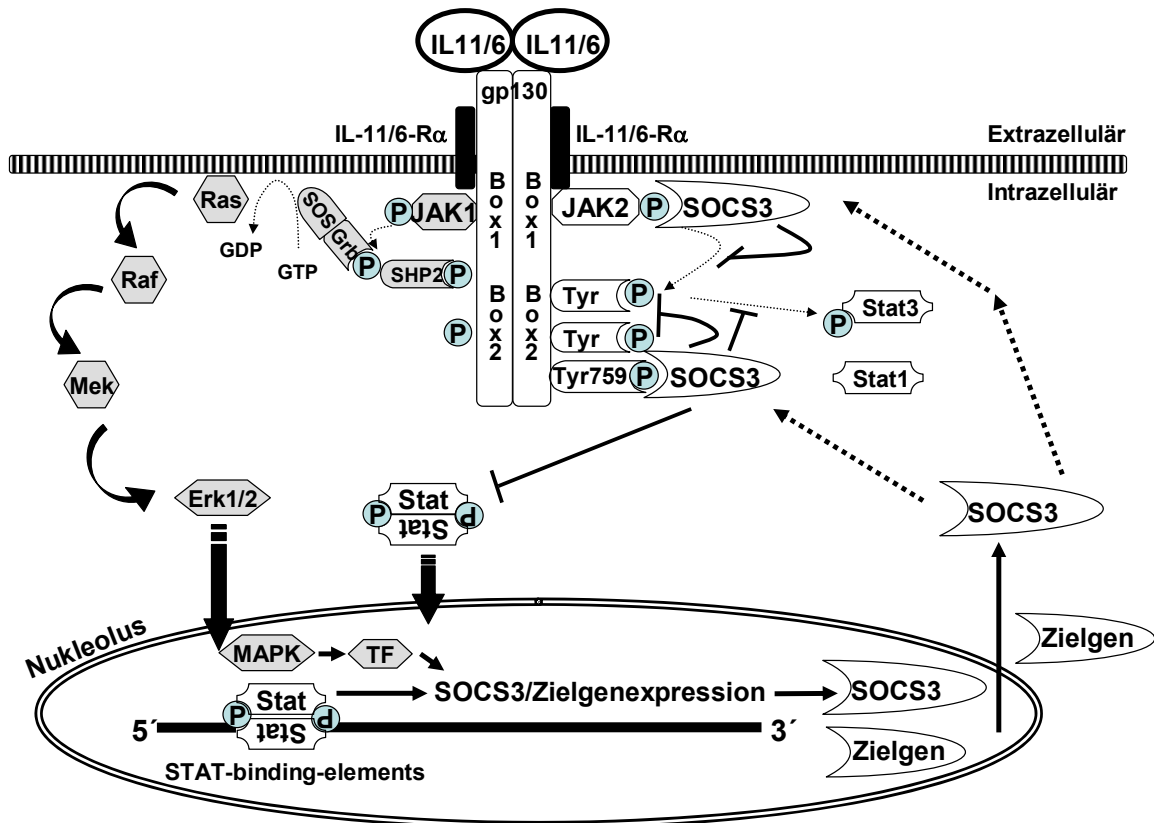


Abb. 32: Die interleukinvermittelte Signaltransduktion von Interleukin-6 und 11 kann über den ubiquitär üblichen Ras-Map-Kinase-Pathway ablaufen. Dabei binden SH2-Phosphatasen an tyrosinphosphorylierte Enden der Box2. Die SHP2 werden durch Jak1 phosphoryliert und binden Grb2. Der dadurch aktivierte Guanin-Nukleotid-Austauscher „SOS“ induziert eine Aktivierung des membrangebundenen und GTP-abhängigen Ras und infolgedessen eine Aktivierung der Kinasen Raf, Mek und MAP (Erk1/2, p38 und JNK). Die MAP-Kinasen führen über Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Transkription bestimmter Zielgene im Zellkern. Der häufig von Interleukin-6 und 11 induzierte Jak-STAT-Pathway beginnt mit der Autophosphorylierung von Jak2 an der Box1 des gp130-Rezeptors. Jak2 induziert eine Tyrosinphosphorylierung an der Box2-Region des gp130-Rezeptors. STAT-Moleküle gehen eine transiente Bindung mit diesen phosphorylierten Tyrosinresten ein und werden ebenfalls phosphoryliert. Die aktivierten phosphorylierten STAT-Moleküle bilden Homo- oder Heterodimere und gelangen auf bisher unklarem Weg in den Nukleolus. Dort binden sie an die DNA und induzieren die Transkription der Zielgene. Zudem können sie an sog. STAT-binding-elements der Promotorregion von SOCS3 binden und die Produktion von SOCS3 initiieren. SOCS3 gelangt ins Zytosol und bewirkt hier eine Feedbackhemmung. Es blockiert JAK 2 durch Bindung direkt. Zudem bindet SOCS3 mit einer sehr hohen Affinität direkt an den gp130-Rezeptor (über Tyr759) und hemmt dadurch die Phosphorylierung der Box2 sowie die Bindung der STAT-Moleküle an den gp130-Rezeptor. Eine weitere zytokinvermittelte Produktion der Zielgene über die STATs ist damit gehemmt. (Eigene Abbildung)

6. Literaturverzeichnis

Akira,S, Y Nishio, M Inoue, X J Wang, S Wei, T Matsusaka, K Yoshida, T Sudo, M Naruto, T Kishimoto, 1994, Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway
1: Cell, v. 77, p. 63-71.

Arzt,E, 2001, gp130 cytokine signaling in the pituitary gland: a paradigm for cytokine-neuroendocrine pathways: J.Clin.Invest, v. 108, p. 1729-1733.

Auernhammer,CJ, C Bousquet, V Chesnokova, S Melmed, 2000, SOCS proteins: modulators of neuroimmunoendocrine functions. Impact on corticotroph LIF signaling:
Ann.N.Y.Acad.Sci., v. 917, p. 658-664.

Auernhammer,CJ, C Bousquet, S Melmed, 1999, Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter:
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 96, p. 6964-6969.

Auernhammer,CJ, V Chesnokova, C Bousquet, S Melmed, 1998a, Pituitary corticotroph SOCS-3: novel intracellular regulation of leukemia-inhibitory factor-mediated proopiomelanocortin gene expression and adrenocorticotropin secretion: Mol.Endocrinol., v. 12, p. 954-961.

Auernhammer,CJ, V Chesnokova, S Melmed, 1998b, Leukemia inhibitory factor modulates interleukin-1beta-induced activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis:
Endocrinology, v. 139, p. 2201-2208.

Auernhammer,CJ, S Melmed, 1999, Interleukin-11 stimulates proopiomelanocortin gene expression and adrenocorticotropin secretion in corticotroph cells: evidence for a redundant cytokine network in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: Endocrinology, v. 140, p. 1559-1566.

Auernhammer,CJ, S Melmed, 2000, Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function: Endocr.Rev., v. 21, p. 313-345.

Auernhammer,CJ, S Melmed, 2001, The central role of SOCS-3 in integrating the neuro-immunoendocrine interface: J.Clin.Invest, v. 108, p. 1735-1740.

Auernhammer,CJ, Kopp FB, 2004, Comparative study of gp130 cytokine effects on corticotroph AtT-20 cells--redundancy or specificity of neuroimmunoendocrine modulators?: Neuroimmunomodulation, v. 11, p. 224-232.

Barton,VA, M A Hall, K R Hudson, J K Heath, 2000, Interleukin-11 signals through the formation of a hexameric receptor complex
4: J.Biol.Chem., v. 275, p. 36197-36203.

Barton,VA, K R Hudson, J K Heath, 1999, Identification of three distinct receptor binding sites of murine interleukin-11
5: J.Biol.Chem., v. 274, p. 5755-5761.

Baumann,H, P Schendel, 1991, Interleukin-11 regulates the hepatic expression of the same plasma protein genes as interleukin-6

1: J.Biol.Chem., v. 266, p. 20424-20427.

Baumann,H, Y Wang, K K Morella, C F Lai, H Dams, D J Hilton, R G Hawley, A Mackiewicz, 1996, Complex of the soluble IL-11 receptor and IL-11 acts as IL-6-type cytokine in hepatic and nonhepatic cells

1: J.Immunol., v. 157, p. 284-290.

Besedovsky,HO, A del Rey, 1996, Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses

2: Endocr.Rev., v. 17, p. 64-102.

Bethin,KE, S K Vogt, L J Muglia, 2000, Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation

2: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 97, p. 9317-9322.

Bild,AH, J Turkson, R Jove, 2002, Cytoplasmic transport of Stat3 by receptor-mediated endocytosis

18: EMBO J., v. 21, p. 3255-3263.

Bornstein,SR, H Rutkowski, I Vrezas, 2004, Cytokines and steroidogenesis

13: Mol.Cell Endocrinol., v. 215, p. 135-141.

Boulton,TG, Z Zhong, Z Wen, J E Darnell, Jr., N Stahl, G D Yancopoulos, 1995, STAT3 activation by cytokines utilizing gp130 and related transducers involves a secondary modification requiring an H7-sensitive kinase

1: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 92, p. 6915-6919.

Bousquet,C, C Susini, S Melmed, 1999, Inhibitory roles for SHP-1 and SOCS-3 following pituitary proopiomelanocortin induction by leukemia inhibitory factor

1: J.Clin.Invest, v. 104, p. 1277-1285.

Chesnokova,V, S Melmed, 2000, Leukemia inhibitory factor mediates the hypothalamic pituitary adrenal axis response to inflammation

2: Endocrinology, v. 141, p. 4032-4040.

Chesnokova,V, S Melmed, 2002, Minireview: Neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules

1: Endocrinology, v. 143, p. 1571-1574.

Chiu,CP, C Moulds, R L Coffman, D Rennick, F Lee, 1988, Multiple biological activities are expressed by a mouse interleukin 6 cDNA clone isolated from bone marrow stromal cells

46: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 85, p. 7099-7103.

Cooney,RN, 2002, Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway

1: Shock, v. 17, p. 83-90.

Curtis,DJ, D J Hilton, B Roberts, L Murray, N Nicola, C G Begley, 1997, Recombinant soluble interleukin-11 (IL-11) receptor alpha-chain can act as an IL-11 antagonist

1: Blood, v. 90, p. 4403-4412.

Czupryn,M, F Bennett, J Dube, K Grant, H Scoble, H Sookdeo, J M McCoy, 1995a, Alanine-scanning mutagenesis of human interleukin-11: identification of regions important for biological activity: *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, v. 762, p. 152-164.

Czupryn,MJ, J M McCoy, H A Scoble, 1995b, Structure-function relationships in human interleukin-11. Identification of regions involved in activity by chemical modification and site-directed mutagenesis: *J.Biol.Chem.*, v. 270, p. 978-985.

Dahmen,H, U Horsten, A Kuster, Y Jacques, S Minvielle, I M Kerr, G Ciliberto, G Paonessa, P C Heinrich, G Muller-Newen, 1998, Activation of the signal transducer gp130 by interleukin-11 and interleukin-6 is mediated by similar molecular interactions: *Biochem.J.*, v. 331 (Pt 3), p. 695-702.

David,M, E Petricoin, III, C Benjamin, R Pine, M J Weber, A C Lerner, 1995, Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins
2: *Science*, v. 269, p. 1721-1723.

Davidson,AJ, S A Freeman, K E Crosier, C R Wood, P S Crosier, 1997, Expression of murine interleukin 11 and its receptor alpha-chain in adult and embryonic tissues
1: *Stem Cells*, v. 15, p. 119-124.

Decker,T, P Kovarik, 2000, Serine phosphorylation of STATs
2: *Oncogene*, v. 19, p. 2628-2637.

Derouet,D, F Rousseau, F Alfonsi, J Froger, J Hermann, F Barbier, D Perret, C Diveu, C Guillet, L Preisser, A Dumont, M Barbado, A Morel, O deLapeyriere, H Gascan, S Chevalier, 2004, Neuropeptin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 101, p. 4827-4832.

Du,X, E T Everett, G Wang, W H Lee, Z Yang, D A Williams, 1996, Murine interleukin-11 (IL-11) is expressed at high levels in the hippocampus and expression is developmentally regulated in the testis
1: *J.Cell Physiol*, v. 168, p. 362-372.

Du,X, D A Williams, 1997, Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use: *Blood*, v. 89, p. 3897-3908.

Du,XX, D A Williams, 1994, Interleukin-11: a multifunctional growth factor derived from the hematopoietic microenvironment: *Blood*, v. 83, p. 2023-2030.

Emanuelli,B, P Peraldi, C Filloux, D Sawka-Verhelle, D Hilton, E Van Obberghen, 2000, SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling
1: *J.Biol.Chem.*, v. 275, p. 15985-15991.

Endo,TA, M Masuhara, M Yokouchi, R Suzuki, H Sakamoto, K Mitsui, A Matsumoto, S Tanimura, M Ohtsubo, H Misawa, T Miyazaki, N Leonor, T Taniguchi, T Fujita, Y Kanakura, S Komiya, A Yoshimura, 1997, A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases
1: *Nature*, v. 387, p. 921-924.

Franchimont,D, G Bouma, J Galon, G W Wolkersdorfer, A Haidan, G P Chrousos, S R Bornstein, 2000, Adrenal cortical activation in murine colitis

1: *Gastroenterology*, v. 119, p. 1560-1568.

Fujitani, Y, M Hibi, T Fukada, M Takahashi-Tezuka, H Yoshida, T Yamaguchi, K Sugiyama, Y Yamanaka, K Nakajima, T Hirano, 1997, An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT

1: *Oncogene*, v. 14, p. 751-761.

Gadient, RA, P H Patterson, 1999, Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury

9: *Stem Cells*, v. 17, p. 127-137.

Gautron, L, P Lafon, G Tramu, S Laye, 2003, In vivo activation of the interleukin-6 receptor/gp130 signaling pathway in pituitary corticotropes of lipopolysaccharide-treated rats

3: *Neuroendocrinology*, v. 77, p. 32-43.

Gerez, J, J Bonfiglio, S Sosa, D Giacomini, M Acuna, N A Carbia, M Perone, S Silberstein, U Renner, G K Stalla, E Arzt, 2007, Molecular transduction mechanisms of cytokine/hormones interactions: role of gp130 cytokines

2: *Exp. Physiol.*

Gomez-Lechon, MJ, 1999, Oncostatin M: signal transduction and biological activity

1: *Life Sci.*, v. 65, p. 2019-2030.

Grosfeld, JL, X Du, D A Williams, 1999, Interleukin-11: its biology and prospects for clinical use: *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.*, v. 23, p. S67-S69.

Haan, C, S Kreis, C Margue, I Behrmann, 2006, Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship

1: *Biochem. Pharmacol.*, v. 72, p. 1538-1546.

Haque, SJ, P Harbor, M Tabrizi, T Yi, B R Williams, 1998, Protein-tyrosine phosphatase Shp-1 is a negative regulator of IL-4- and IL-13-dependent signal transduction

2: *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 33893-33896.

Heinrich, PC, I Behrmann, S Haan, H M Hermanns, G Muller-Newen, F Schaper, 2003, Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation

3: *Biochem. J.*, v. 374, p. 1-20.

Heinrich, PC, I Behrmann, G Muller-Newen, F Schaper, L Graeve, 1998, Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway: *Biochem. J.*, v. 334 (Pt 2), p. 297-314.

Herrington, J, L Rui, G Luo, L Y Yu-Lee, C Carter-Su, 1999, A functional DNA binding domain is required for growth hormone-induced nuclear accumulation of Stat5B

4: *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 5138-5145.

Hilton, DJ, R T Richardson, W S Alexander, E M Viney, T A Willson, N S Sprigg, R Starr, S E Nicholson, D Metcalf, N A Nicola, 1998, Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes

4: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 95, p. 114-119.

- Hirano,T, T Taga, K Yamasaki, T Matsuda, K Yasukawa, Y Hirata, H Yawata, O Tanabe, S Akira, T Kishimoto, 1989, Molecular cloning of the cDNAs for interleukin-6/B cell stimulatory factor 2 and its receptor
16: *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, v. 557, p. 167-78, discussion.
- Hirano,T, K Yasukawa, H Harada, T Taga, Y Watanabe, T Matsuda, S Kashiwamura, K Nakajima, K Koyama, A Iwamatsu, ., 1986, Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin
2: *Nature*, v. 324, p. 73-76.
- Horvath,CM, 2000, STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals
1: *Trends Biochem.Sci.*, v. 25, p. 496-502.
- Horvath,CM, Z Wen, J E Darnell, Jr., 1995, A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain
1: *Genes Dev.*, v. 9, p. 984-994.
- Ihle,JN, I M Kerr, 1995, Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily
5: *Trends Genet.*, v. 11, p. 69-74.
- Imada,K, W J Leonard, 2000, The Jak-STAT pathway
1: *Mol.Immunol.*, v. 37, p. 1-11.
- Jiao,H, K Berrada, W Yang, M Tabrizi, L C Plataniias, T Yi, 1996, Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1
1: *Mol.Cell Biol.*, v. 16, p. 6985-6992.
- Judd,AM, G B Call, M Barney, C J McIlmoil, A G Balls, A Adams, G K Oliveira, 2000, Possible function of IL-6 and TNF as intraadrenal factors in the regulation of adrenal steroid secretion
4: *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, v. 917, p. 628-637.
- Kamura,T, S Sato, D Haque, L Liu, W G Kaelin, Jr., R C Conaway, J W Conaway, 1998, The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families
1: *Genes Dev.*, v. 12, p. 3872-3881.
- Kim,H, T S Hawley, R G Hawley, H Baumann, 1998, Protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2) moderates signaling by gp130 but is not required for the induction of acute-phase plasma protein genes in hepatic cells
9: *Mol.Cell Biol.*, v. 18, p. 1525-1533.
- Kishimoto,T, S Akira, T Taga, 1992, Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines
1: *Science*, v. 258, p. 593-597.
- Kovarik,P, M Mangold, K Ramsauer, H Heidari, R Steinborn, A Zotter, D E Levy, M Muller, T Decker, 2001, Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression
2: *EMBO J.*, v. 20, p. 91-100.

Kurth,I, U Horsten, S Pflanz, H Dahmen, A Kuster, J Grotzinger, P C Heinrich, G Muller-Newen, 1999, Activation of the signal transducer glycoprotein 130 by both IL-6 and IL-11 requires two distinct binding epitopes: *J.Immunol.*, v. 162, p. 1480-1487.

Larsen,L, C Ropke, 2002, Suppressors of cytokine signalling: SOCS
1: *APMIS*, v. 110, p. 833-844.

Lebeau,B, F A Montero Julian, J Wijdenes, G Muller-Newen, H Dahmen, M Chereil, P C Heinrich, H Brailly, M M Hallet, A Godard, S Minvielle, Y Jacques, 1997, Reconstitution of two isoforms of the human interleukin-11 receptor and comparison of their functional properties
1: *FEBS Lett.*, v. 407, p. 141-147.

Leonard,WJ, J J O'Shea, 1998, Jaks and STATs: biological implications
2: *Annu.Rev.Immunol.*, v. 16, p. 293-322.

Lew,DJ, T Decker, I Strehlow, J E Darnell, 1991, Overlapping elements in the guanylate-binding protein gene promoter mediate transcriptional induction by alpha and gamma interferons
3: *Mol.Cell Biol.*, v. 11, p. 182-191.

Lindberg,RA, T S Juan, A A Welcher, Y Sun, R Cupples, B Guthrie, F A Fletcher, 1998, Cloning and characterization of a specific receptor for mouse oncostatin M
1: *Mol.Cell Biol.*, v. 18, p. 3357-3367.

Magrangeas,F, O Boisteau, S Denis, Y Jacques, S Minvielle, 2001, Negative cross-talk between interleukin-3 and interleukin-11 is mediated by suppressor of cytokine signalling-3 (SOCS-3)
10: *Biochem.J.*, v. 353, p. 223-230.

Mastorakos,G, G P Chrousos, J S Weber, 1993, Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans
1: *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, v. 77, p. 1690-1694.

Masuhara,M, H Sakamoto, A Matsumoto, R Suzuki, H Yasukawa, K Mitsui, T Wakioka, S Tanimura, A Sasaki, H Misawa, M Yokouchi, M Ohtsubo, A Yoshimura, 1997, Cloning and characterization of novel CIS family genes
1: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 239, p. 439-446.

Matsumoto,A, M Masuhara, K Mitsui, M Yokouchi, M Ohtsubo, H Misawa, A Miyajima, A Yoshimura, 1997, CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation
5: *Blood*, v. 89, p. 3148-3154.

McBride,KM, G Banninger, C McDonald, N C Reich, 2002, Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha
3: *EMBO J.*, v. 21, p. 1754-1763.

McKinley,D, Q Wu, T Yang-Feng, Y C Yang, 1992, Genomic sequence and chromosomal location of human interleukin-11 gene (IL11): *Genomics*, v. 13, p. 814-819.

Michl,P, T Beikler, D Engelhardt, M M Weber, 2000, Interleukin-3 and interleukin-6 stimulate bovine adrenal cortisol secretion through different pathways

1: *J.Neuroendocrinol.*, v. 12, p. 23-28.

Mikita,T, C Daniel, P Wu, U Schindler, 1998, Mutational analysis of the STAT6 SH2 domain
2: *J.Biol.Chem.*, v. 273, p. 17634-17642.

Minamoto,S, K Ikegame, K Ueno, M Narazaki, T Naka, H Yamamoto, T Matsumoto, H Saito, S Hosoe, T Kishimoto, 1997, Cloning and functional analysis of new members of STAT induced STAT inhibitor (SSI) family: SSI-2 and SSI-3

1: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 237, p. 79-83.

Morris,JC, S Neben, F Bennett, H Finnerty, A Long, D R Beier, S Kovacic, J M McCoy, E DiBlasio-Smith, E R La Vallie, A Caruso, J Calvetti, G Morris, N Weich, S R Paul, P S Crosier, K J Turner, C R Wood, 1996, Molecular cloning and characterization of murine interleukin-11: *Exp.Hematol.*, v. 24, p. 1369-1376.

Murakami,M, M Hibi, N Nakagawa, T Nakagawa, K Yasukawa, K Yamanishi, T Taga, T Kishimoto, 1993, IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase

1: *Science*, v. 260, p. 1808-1810.

Muramami,N, J Fukata, T Tsukada, H Kobayashi, O Ebisui, H Segawa, S Muro, H Imura, K Nakao, 1993, Bacterial lipopolysaccharide-induced expression of interleukin-6 messenger ribonucleic acid in the rat hypothalamus, pituitary, adrenal gland, and spleen

1: *Endocrinology*, v. 133, p. 2574-2578.

Musashi,M, S C Clark, T Sudo, D L Urdal, M Ogawa, 1991a, Synergistic interactions between interleukin-11 and interleukin-4 in support of proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice

1: *Blood*, v. 78, p. 1448-1451.

Musashi,M, Y C Yang, S R Paul, S C Clark, T Sudo, M Ogawa, 1991b, Direct and synergistic effects of interleukin 11 on murine hemopoiesis in culture

3: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 88, p. 765-769.

Naka,T, M Narazaki, M Hirata, T Matsumoto, S Minamoto, A Aono, N Nishimoto, T Kajita, T Taga, K Yoshizaki, S Akira, T Kishimoto, 1997, Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor

2: *Nature*, v. 387, p. 924-929.

Neddermann,P, R Graziani, G Ciliberto, G Paonessa, 1996, Functional expression of soluble human interleukin-11 (IL-11) receptor alpha and stoichiometry of in vitro IL-11 receptor complexes with gp130

1: *J.Biol.Chem.*, v. 271, p. 30986-30991.

Ng,J, D Cantrell, 1997, STAT3 is a serine kinase target in T lymphocytes. Interleukin 2 and T cell antigen receptor signals converge upon serine 727

1: *J.Biol.Chem.*, v. 272, p. 24542-24549.

Nicholson,SE, D De Souza, L J Fabri, J Corbin, T A Willson, J G Zhang, A Silva, M Asimakis, A Farley, A D Nash, D Metcalf, D J Hilton, N A Nicola, M Baca, 2000, Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130

1: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 97, p. 6493-6498.

- Nicholson,SE, T A Willson, A Farley, R Starr, J G Zhang, M Baca, W S Alexander, D Metcalf, D J Hilton, N A Nicola, 1999, Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction
5: EMBO J., v. 18, p. 375-385.
- O'Shea,JJ, M Gadina, R D Schreiber, 2002, Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway
2: Cell, v. 109 Suppl, p. S121-S131.
- Ohsumi,J, K Miyadai, I Kawashima, H Ishikawa-Ohsumi, S Sakakibara, K Mita-Honjo, Y Takiguchi, 1991, Adipogenesis inhibitory factor. A novel inhibitory regulator of adipose conversion in bone marrow: FEBS Lett., v. 288, p. 13-16.
- Ohya,K, S Kajigaya, Y Yamashita, A Miyazato, K Hatake, Y Miura, U Ikeda, K Shimada, K Ozawa, H Mano, 1997, SOCS-1/JAB/SSI-1 can bind to and suppress Tec protein-tyrosine kinase
1: J.Biol.Chem., v. 272, p. 27178-27182.
- Okabe,S, T Tauchi, H Morita, H Ohashi, A Yoshimura, K Ohyashiki, 1999, Thrombopoietin induces an SH2-containing protein, CIS1, which binds to Mpl: involvement of the ubiquitin proteasome pathway
1: Exp.Hematol., v. 27, p. 1542-1547.
- Opal,SM, J C Keith, Jr., J Jhung, J E Palardy, N Parejo, E Marchese, V Maganti, 2003, Orally administered recombinant human interleukin-11 is protective in experimental neutropenic sepsis
2: J.Infect.Dis., v. 187, p. 70-76.
- Papanicolaou,DA, R L Wilder, S C Manolagas, G P Chrousos, 1998, The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease
14: Ann.Intern.Med., v. 128, p. 127-137.
- Path,G, W A Scherbaum, S R Bornstein, 2000, The role of interleukin-6 in the human adrenal gland
1: Eur.J.Clin.Invest, v. 30 Suppl 3, p. 91-95.
- Paul,SR, F Bennett, J A Calvetti, K Kelleher, C R Wood, R M O'Hara, Jr., A C Leary, B Sibley, S C Clark, D A Williams, ., 1990, Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine:
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 87, p. 7512-7516.
- Pircher,TJ, H Petersen, J A Gustafsson, L A Haldosen, 1999, Extracellular signal-regulated kinase (ERK) interacts with signal transducer and activator of transcription (STAT) 5a
1: Mol.Endocrinol., v. 13, p. 555-565.
- Rainey,WE, K Saner, B P Schimmer, 2004, Adrenocortical cell lines
2: Mol.Cell Endocrinol., v. 228, p. 23-38.
- Ray,D, S Melmed, 1997, Pituitary cytokine and growth factor expression and action
4: Endocr.Rev., v. 18, p. 206-228.

Robb,L, D J Hilton, T A Willson, C G Begley, 1996, Structural analysis of the gene encoding the murine interleukin-11 receptor alpha-chain and a related locus
1: J.Biol.Chem., v. 271, p. 13754-13761.

Rose-John,S, H Schooltink, H Schmitz-Van de Leur, J Mullberg, P C Heinrich, L Graeve, 1993, Intracellular retention of interleukin-6 abrogates signaling
1: J.Biol.Chem., v. 268, p. 22084-22091.

Schmitz,J, M Weissenbach, S Haan, P C Heinrich, F Schaper, 2000, SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130
1: J.Biol.Chem., v. 275, p. 12848-12856.

Schwertschlag,US, W L Trepicchio, K H Dykstra, J C Keith, K J Turner, A J Dorner, 1999, Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11
3: Leukemia, v. 13, p. 1307-1315.

Sekimoto,T, N Imamoto, K Nakajima, T Hirano, Y Yoneda, 1997, Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1
3: EMBO J., v. 16, p. 7067-7077.

Shimon,I, X Yan, D W Ray, S Melmed, 1997, Cytokine-dependent gp130 receptor subunit regulates human fetal pituitary adrenocorticotropin hormone and growth hormone secretion
5: J.Clin.Invest, v. 100, p. 357-363.

Somers,W, M Stahl, J S Seehra, 1997, 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling
1: EMBO J., v. 16, p. 989-997.

Starr,R, T A Willson, E M Viney, L J Murray, J R Rayner, B J Jenkins, T J Gonda, W S Alexander, D Metcalf, N A Nicola, D J Hilton, 1997, A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling
1: Nature, v. 387, p. 917-921.

Tacke,I, H Dahmen, O Boisteau, S Minvielle, Y Jacques, J Grotzinger, A Kuster, U Horsten, C Blanc, F A Montero-Julian, P C Heinrich, G Muller-Newen, 1999, Definition of receptor binding sites on human interleukin-11 by molecular modeling-guided mutagenesis
3: Eur.J.Biochem., v. 265, p. 645-655.

Taga,T, 1996, Gp130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuroipoietic cytokines: J.Neurochem., v. 67, p. 1-10.

Taga,T, 1997, The signal transducer gp130 is shared by interleukin-6 family of haematopoietic and neurotrophic cytokines
9: Ann.Med., v. 29, p. 63-72.

Taga,T, M Hibi, Y Hirata, K Yamasaki, K Yasukawa, T Matsuda, T Hirano, T Kishimoto, 1989, Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130
3: Cell, v. 58, p. 573-581.

Taga,T, T Kishimoto, 1997, Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines

11: *Annu.Rev.Immunol.*, v. 15, p. 797-819.

Tanaka,M, T Hara, N G Copeland, D J Gilbert, N A Jenkins, A Miyajima, 1999,
Reconstitution of the functional mouse oncostatin M (OSM) receptor: molecular cloning of
the mouse OSM receptor beta subunit
6: *Blood*, v. 93, p. 804-815.

Trepicchio,WL, A J Dorner, 1998a, Interleukin-11. A pg 130 cytokine
2: *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, v. 856, p.12-21.

Trepicchio,WL, A J Dorner, 1998b, The therapeutic utility of Interleukin-11 in the treatment
of inflammatory disease
1: *Expert.Opin.Investig.Drugs*, v. 7, p. 1501-1504.

Tsuji,K, S D Lyman, T Sudo, S C Clark, M Ogawa, 1992, Enhancement of murine
hematopoiesis by synergistic interactions between steel factor (ligand for c-kit), interleukin-
11, and other early acting factors in culture
2: *Blood*, v. 79, p. 2855-2860.

Turkson,J, T Bowman, J Adnane, Y Zhang, J Y Djeu, M Sekharam, D A Frank, L B
Holzman, J Wu, S Sebti, R Jove, 1999, Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-
terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein
1: *Mol.Cell Biol.*, v. 19, p. 7519-7528.

Vallieres,L, S Rivest, 1999, Interleukin-6 is a needed proinflammatory cytokine in the
prolonged neural activity and transcriptional activation of corticotropin-releasing factor
during endotoxemia
1: *Endocrinology*, v. 140, p. 3890-3903.

Vlotides,G, K Zitzmann, G K Stalla, C J Auernhammer, 2004, Novel neurotrophin-1/B cell-
stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3)/cardiotrophin-like cytokine (CLC)--a novel gp130
cytokine with pleiotropic functions: *Cytokine Growth Factor Rev.*, v. 15, p. 325-336.

Wang,QM, K L Guan, P J Roach, A A DePaoli-Roach, 1995, Phosphorylation and activation
of the ATP-Mg-dependent protein phosphatase by the mitogen-activated protein kinase
2: *J.Biol.Chem.*, v. 270, p. 18352-18358.

Wang,Z, S G Ren, S Melmed, 1996, Hypothalamic and pituitary leukemia inhibitory factor
gene expression in vivo: a novel endotoxin-inducible neuro-endocrine interface
2: *Endocrinology*, v. 137, p. 2947-2953.

Ward,LD, A Hammacher, G J Howlett, J M Matthews, L Fabri, R L Moritz, E C Nice, J
Weinstock, R J Simpson, 1996, Influence of interleukin-6 (IL-6) dimerization on formation of
the high affinity hexameric IL-6.receptor complex
1: *J.Biol.Chem.*, v. 271, p. 20138-20144.

Weber,MM, P Michl, C J Auernhammer, D Engelhardt, 1997, Interleukin-3 and interleukin-6
stimulate cortisol secretion from adult human adrenocortical cells: *Endocrinology*, v. 138, p.
2207-2210.

Wen,Z, Z Zhong, J E Darnell, Jr., 1995, Maximal activation of transcription by Stat1 and
Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation
1: *Cell*, v. 82, p. 241-250.

Xu,GY, H A Yu, J Hong, M Stahl, T McDonagh, L E Kay, D A Cumming, 1997, Solution structure of recombinant human interleukin-6
4: *J.Mol.Biol.*, v. 268, p. 468-481.

Xu,X, Y L Sun, T Hoey, 1996, Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain
3: *Science*, v. 273, p. 794-797.

Yang,L, Y C Yang, 1994, Regulation of interleukin (IL)-11 gene expression in IL-1 induced primate bone marrow stromal cells: *J.Biol.Chem.*, v. 269, p. 32732-32739.

Yang,XP, F Schaper, A Teubner, F Lammert, P C Heinrich, S Matern, E Siewert, 2005, Interleukin-6 plays a crucial role in the hepatic expression of SOCS3 during acute inflammatory processes in vivo
1: *J.Hepatol.*, v. 43, p. 704-710.

Yasukawa,H, H Misawa, H Sakamoto, M Masuhara, A Sasaki, T Wakioka, S Ohtsuka, T Imaizumi, T Matsuda, J N Ihle, A Yoshimura, 1999, The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop
3: *EMBO J.*, v. 18, p. 1309-1320.

Yin,T, T Taga, M L Tsang, K Yasukawa, T Kishimoto, Y C Yang, 1993, Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction
2: *J.Immunol.*, v. 151, p. 2555-2561.

Yin,T, Y C Yang, 1994, Mitogen-activated protein kinases and ribosomal S6 protein kinases are involved in signaling pathways shared by interleukin-11, interleukin-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in mouse 3T3-L1 cells: *J.Biol.Chem.*, v. 269, p. 3731-3738.

Yin,TG, P Schendel, Y C Yang, 1992, Enhancement of in vitro and in vivo antigen-specific antibody responses by interleukin 11
1: *J.Exp.Med.*, v. 175, p. 211-216.

Yoshimura,A, T Ohkubo, T Kiguchi, N A Jenkins, D J Gilbert, N G Copeland, T Hara, A Miyajima, 1995, A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors
2: *EMBO J.*, v. 14, p. 2816-2826.

You,M, D H Yu, G S Feng, 1999, Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway
2: *Mol.Cell Biol.*, v. 19, p. 2416-2424.

Zhang,JG, A Farley, S E Nicholson, T A Willson, L M Zugaro, R J Simpson, R L Moritz, D Cary, R Richardson, G Hausmann, B J Kile, S B Kent, W S Alexander, D Metcalf, D J Hilton, N A Nicola, M Baca, 1999, The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation
3: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 96, p. 2071-2076.

Zhong,Z, Z Wen, J E Darnell, Jr., 1994, Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6
1: *Science*, v. 264, p. 95-98.

7. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Engelhardt für die Überlassung des Arbeitsplatzes im endokrinologischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik II, Klinikum Großhadern, und für seinen Einsatz bei der Betreuung der Forschungsarbeiten. Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. med. Göke für die Ermöglichung, meine wissenschaftliche Arbeit in seiner Abteilung weiterzuführen.

Danken möchte ich Herrn PD Dr. med. Weber, der mich in die Endokrinologie sowie in die Forschungsarbeit mit humanen Zellkulturen und in vitro Zellversuchen eingeführt hat.

Mein Dank gilt vor allem Herrn PD Dr. med. Auernhammer für die Fortsetzung der Betreuung meiner Doktorarbeit, für die engagierte und fachlich sehr kompetente Führung meiner wissenschaftlichen Arbeit und die kritische Durchsicht meiner Abhandlung.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Michl für die Einarbeitung im Labor und die fachliche Unterstützung bei der Ausarbeitung der Versuchsanordnungen.

Allen Mitarbeitern des endokrinologischen Forschungslabors – insbesondere Frau Adelman und Herrn Spöttl - gilt mein besonderer Dank für die immer hilfsbereite Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die fachkompetente Anleitung und Unterstützung im Umgang mit Zellen, Geräten und Versuchsanordnungen.

Bei Frau Dr. med. Dorn, Herrn Kopp und Herrn Dr. med. Vlotides möchte ich mich für die kollegiale und angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Danken möchte ich meinen Eltern für die stete Förderung meiner Forschungsarbeit.

Mein größter Dank gilt meinem Freund und Ehemann Alexander Siegmund für die immer währende Unterstützung meiner Forschungsarbeit, die Diskussionsbereitschaft und kritische Beurteilung der Ausarbeitung meiner Abhandlung in Schrift und Form.

8. Lebenslauf

Persönliches

Name, Familienstand: Annette Siegmund geb. Dietrich, verheiratet
Geburtsdatum/ -ort: 06. Mai 1976 in Achern

Schulbildung

09/1982 - 07/ 1986 Gundschule a.d. Drostehülshoffstrasse, München
09/1986 - 06/1995 Ludwigsgymnasium, München
1995 Abitur (Leistungskurse: Mathematik / Biologie): Note 1,7

Studium

11/1995 - 06/2002 Studium der Humanmedizin a.d. LMU München: Note: 1,99
09/1997 Physikum
08/1998 I. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2001 II. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2002 III. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Auslandsaufenthalt während dem Studium

8/2000 - 9/2000 Famulatur Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Southampton U.K.

Praktisches Jahr

1. Tertial Gynäkologie u. Geburtshilfe (KH Neuperlach, München)
2. Tertial Innere Medizin (Bezirksspital Aarberg, Schweiz)
3. Tertial Viszeral- u. Unfallchirurgie (KH Harlaching, München)

Beruf

01.09.2002 - 29.02.2004 Ärztin im Praktikum, Innere Medizin (Klinik Augustinum München)
seit 01.03.2004 Assistenzärztin, Innere Medizin (Klinik Augustinum München)