

Einfluss von metabolisch wirksamen Hormonen auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Christina Khouri, MBA

aus Erlangen

Berichter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Fred Schaper
Univ.-Prof. Dr.-Ing. Werner Baumgartner

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2012

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Glucocorticoids increase interleukin-6 dependent gene induction by interfering with the expression of the SOCS 3 feedback inhibitor.

Dittrich, A.*; **Khoury, C.***; Sackett, S.D.; Ehrling, C.; Böhmer, O.; Albrecht, U.; Bode, J.G.; Trautwein, C.; Schaper, F. *Hepatology*, 2012, 55(1), 256-66

Glucagon counteracts interleukin-6 dependent gene expression by redundant action of Epac and PKA.

Khoury, C.; Dittrich, A.; Sackett, S.D.; Denecke, B.; Trautwein, C.; Schaper, F. *Biological Chemistry*, 2011, 392(12), 1123-34

Weitere Veröffentlichungen:

SHPS-1/SIRP1 α contributes to interleukin-6 signalling.

Sobota, R.M.; Müller, J.P.; **Khoury, C.**; Ullrich, A.; Poli, V.; Noguchi, T.; Heinrich, P.C.; Schaper, F. *Cellular Signaling*, 2008, 20, 1385-1391

Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs.

Eulenfeld, R.; Dittrich, A.; **Khoury, C.**; Müller, P.J.; Mütze, B.; Wolf, A.; Schaper, F. *European Journal of Cell Biology*, 2011, [Epub ahead of print]

Model-driven experimental analysis of the function of SHP-2 in IL-6-induced Jak/STAT signaling.

Dittrich, A.*; Quaiser, T.*; **Khoury, C.**; Schwache, D.; Mönnigmann, M.; Schaper, F. *Molecular BioSystems*, 2012, [under revision]

* gleichberechtigte Co-Autoren

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Aglanduläre Hormone	1
1.2 Cytokine	1
1.3 IL-6-Typ Cytokine	1
1.4 IL-6	3
1.5 IL-6-induzierte Signaltransduktion	4
1.5.1 Jak/STAT-Signalweg	4
1.5.2 MAPK-Kaskade	4
1.6 Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion	6
1.6.1 Phosphatasen	6
1.6.2 PIAS-Proteine	6
1.6.3 SOCS-Proteine	7
1.7 Glanduläre Hormone	8
1.7.1 Glucocorticoide	8
1.7.1.1 Glucocorticoid-induzierte Signaltransduktion	9
1.7.1.2 Wechselwirkung von Glucocorticoiden mit anderen Signalwegen	11
1.7.2 Glucagon	12
1.7.2.1 Glucagon-induzierte Signaltransduktion	13
1.7.2.2 Wechselwirkung von cAMP mit anderen Signalwegen	14
1.8 Ziele der Arbeit	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Chemikalien	18
2.2 Cytokine	19
2.3 Antikörper	19
2.4 Plasmide	20
2.5 Prokaryontische Zellen	22
2.5.1 Amplifizierung und Aufreiniugng von Plasmid-DNA	22
2.5.2 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	22
2.6 Eukaryontische Zelllinien	24
2.6.1 Nährmedien und Lösungen	24

2.6.2 Kultivierung	25
2.7 Isolierung von Hepatozyten aus der Maus	25
2.7.1 Nährmedien und Lösungen	27
2.7.2 Kultivierung	27
2.8 Herstellung von Zelllysaten	28
2.9 Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford	28
2.10 SDS-Gelelektrophorese	29
2.11 Western Blot	30
2.12 Detektion der Proteine auf der PVDF-Membran	31
2.13 Rap1- <i>pull-down</i> assay.....	32
2.14 Zellfraktionierung	33
2.15 Reporter-gen-Analyse	34
2.15.1 Transfektion der Zellen.....	34
2.15.2 Herstellung von Zelllysaten	35
2.15.3 Bestimmung der Luziferase-Aktivität	35
2.15.4 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität.....	35
2.16 <i>in vivo</i> -Versuche an der Maus	36
2.16.1 Gewinnung von Blutserum	36
2.16.2 Gewinnung von RNA aus Lebergewebe	36
2.17 ELISA.....	37
2.18 <i>Real-Time</i> -quantitative-PCR	37
2.18.1 RNA-Isolation	37
2.18.2 cDNA-Synthese.....	37
2.18.3 <i>TaqMan</i> ® PCR.....	38
2.19 Konfokale Mikroskopie	39
2.19.1 Fixierung von Zellen ohne Antikörper.....	39
2.19.2 Fixierung von Zellen mit Antikörpern	40
2.20 Microarray	41
3 Ergebnisse	42
3.1 <i>Cross-talk</i> zwischen Glucocorticoiden und IL-6	42

3.1.1	Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Genexpression	42
3.1.2	Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die STAT3-Phosphorylierung	44
3.1.3	Glucocorticoide reduzieren die IL-6-induzierte SOCS3-Proteinexpression	46
3.1.4	Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die STAT3-Phosphorylierung in der Abwesenheit von SOCS3	47
3.1.5	Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion bei Mutation des SOCS3-Rekrutierungsmotivs von gp130	49
3.1.6	Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Genexpression <i>in vivo</i>	52
3.1.7	Glucocorticoide beeinflussen nicht die Induktion der SOCS3-Expression	54
3.1.8	Glucocorticoide beeinflussen nicht die SOCS3-mRNA Expression	57
3.1.9	Glucocorticoide beeinflussen weder die mRNA-Stabilität noch die Proteinstabilität von SOCS3	58
3.1.10	Die transkriptionelle Aktivität des Glucocorticoid-Rezeptors ist notwendige Voraussetzung für den Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion	60
3.2	<i>Cross-talk</i> zwischen Glucagon und IL-6	63
3.2.1	Glucagon inhibiert die IL-6-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 ohne die Phosphorylierung von STAT3 zu beeinflussen	63
3.2.2	Genexpressions-Analyse	64
3.2.3	Der Einfluss von Glucagon auf die IL-6-induzierte Genexpression	67
3.2.4	Analyse der Glucagon-induzierten Signalwege im <i>cross-talk</i> mit IL-6	68
3.2.5	Analyse der Effektormoleküle von cAMP	71
3.2.6	Analyse der Redundanz von Epac und PKA	72
3.2.7	Analyse der Aktivierung von Rap1	74
3.2.8	Analyse der Redundanz von Epac und PKA auf Ebene der IL-6-induzierten Genexpression	76

3.2.9 Der Einfluss von Glucagon auf die IL-6-induzierte Genexpression bedarf keiner Proteinneusynthese.....	77
4 Diskussion	80
4.1 Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion ..	80
4.1.1 Die Glucocorticoid-vermittelte Verstärkung der IL-6-induzierten Genexpression	80
4.1.2 Der molekulare Mechanismus der Glucocorticoid-vermittelten Inhibition der SOCS3-Expression.....	82
4.1.3 Die physiologische Bedeutung der Reduktion der SOCS3-Expression durch Glucocorticoide.....	86
4.2 Der Einfluss von Glucagon auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion.....	88
4.2.1 Die Inhibition der IL-6-induzierten MAPK-Kaskade durch Glucagon	88
4.2.2 ERK1/2-abhängige Zielgene von IL-6	90
4.2.3 Der Einfluss von Glucagon auf die IL-6-induzierte Genexpression	92
4.2.4 Die physiologische Bedeutung der Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch Glucagon.....	94
5 Zusammenfassung.....	96
5.1 Die Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch Glucocorticoide	96
5.2 Die Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch Glucagon.....	97
6 Ausblick	99
6.1 Die Inhibition der IL-6-induzierten SOCS3-Proteinexpression durch Glucocorticoide	99
6.2 Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-6	99
6.3 Die Rolle von Rap1 bei der Inhibition der IL-6-induzierten ERK1/2- Phosphorylierung durch Glucagon.....	100
Literaturverzeichnis	101
Anhang.....	115

1 Einleitung

In einem vielzelligen, arbeitsteiligen Organismus üben die Einzelzellen spezifische Funktionen aus. Zur Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen dienen extrazelluläre Signalmoleküle. Diese können entweder exo- oder endogenen Ursprungs sein. Bei den endogen synthetisierten Signalmolekülen spielen vor allem Hormone eine wichtige Rolle, die in aglanduläre und glanduläre Botenstoffe eingeteilt werden können.

1.1 Aglanduläre Hormone

Aglanduläre Hormone werden im Gewebe synthetisiert und anschließend sezerniert. Eine Gruppe von aglandulären Hormonen sind die Cytokine, die alle Polypeptide sind.

1.2 Cytokine

Cytokine regulieren neben der Proliferation und Differenzierung vor allem die Immunantwort von Zellen während Entzündungen oder entzündlichen Krankheiten. Sie agieren dabei über Cytokin-spezifische Zelloberflächen-Rezeptoren und sind in nano- bis pikomolaren Konzentrationen wirksam. Bei Verletzung oder Stress werden die Cytokine schnell synthetisiert und sezerniert, und wirken auto-, para- oder endokrin auf ihre Zielzellen. Die Funktionen der verschiedenen Cytokine sind dabei oft redundant und ihre Wirkungen pleiotrop. Cytokine lassen sich auf Grund ihrer Struktur, ihrer biologischen Funktion oder an Hand ihrer gemeinsam genutzten Rezeptorspezies klassifizieren. Unterteilt man Cytokine in Bezug auf ihre biologische Funktion, ergeben sich vier Klassen: Wachstumsfaktoren, Interleukine (IL), Interferone und Chemokine.

1.3 IL-6-Typ Cytokine

Zur Gruppe der IL-6-Typ Cytokine gehören Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-11 (IL-11), *leukemia inhibitory factor* (LIF), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *Cardiotrophin-1* (CT-1), *cardiotrophin-like cytokine* (CLC), Neuropoetin (NP), Oncostatin M (OSM),

Interleukin-27 (IL-27) und Interleukin-31 (IL-31). Mit Ausnahme von IL-27 gehören die IL-6-Typ Cytokine zur Familie der *four- α -helix-bundle*-Cytokine [1] und dort zur Untergruppe der *longchain* Cytokine [2]. IL-27 ist ein Dimer aus *Ebstein-Barr Virus induced gene* (EBI)-3 und p28. Allen IL-6-Typ Cytokinen, mit Ausnahme von IL-31, ist die Nutzung der Rezeptoruntereinheit Glycoprotein 130 (gp130) gemein (s. Abb. 1). IL-6 und IL-11 signalisieren über ein Homodimer aus gp130. LIF, CNTF, CT-1, CLC, NP und OSM wirken über ein Heterodimer aus gp130 und dem LIF-Rezeptor (LIFR). Im humanen System kann OSM zusätzlich ein Heterodimer aus gp130 und dem Oncostatin M-Rezeptor (OSMR) zur Signalisierung nutzen (zusammengefasst in [3]). IL-27 bindet an ein Heterodimer aus gp130 und dem *WSXWS type I cytokine* (WSX)-1-Rezeptor [4]. IL-31 signalisiert über ein Heterodimer aus dem IL-31-Rezeptor α (IL-31RA) und dem OSMR [5].

Zur Rekrutierung der signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheiten gp130 bzw. gp130 und LIFR müssen IL-6, IL-11, CNTF, CT-1, CLC und NP noch an spezifische α -Rezeptoruntereinheiten binden. Diese gehören, mit Ausnahme des CNTF-Rezeptors, welcher einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker anstelle einer Transmembrandomäne besitzt [6], zu den Typ I Membranrezeptoren [1]. Die α -Rezeptoren sind entscheidend für die Rezeptor-Cytokin-Komplexbildung, spielen jedoch keine Rolle bei der intrazellulären Signalkaskade (zusammengefasst in [3]). Neben ihrer Expression auf der Oberfläche von Zellen können die α -Rezeptoruntereinheiten auch in löslicher Form vorliegen. Diese löslichen Rezeptoren entstehen entweder durch *shedding* [7] oder Translation alternativ gespleißter mRNA [8]. Da die α -Untereinheiten im Gegensatz zu gp130 nicht ubiquitär exprimiert werden, ist es durch Bindung eines Cytokins an seinen löslichen Rezeptor möglich, Zellen zu stimulieren, die den α -Rezeptor nicht auf ihrer Oberfläche tragen.

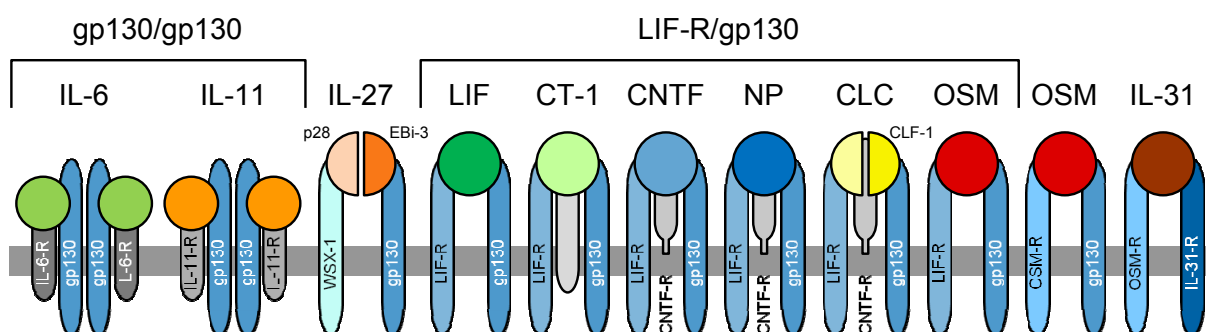


Abb. 1: Rezeptorkomplexe der IL-6-Typ Cytokine

1.4 IL-6

Das Cytokin IL-6 wird hauptsächlich von Zellen des Immunsystems gebildet, kann aber auch von Endothelzellen, Muskelzellen und Mikrogliazellen sezerniert werden [9]. Es hat einen pleiotropen Wirkungsbereich und ist neben der Proliferation und Differenzierung von Zellen hauptsächlich an der Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt. IL-6 hat sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften und spielt besonders als Induktor der Akutphase-Proteinexpression in der Leber eine wichtige Rolle [10]. Neben seiner Funktion als inflammatorisches Cytokin kommen IL-6 auch regulatorische Eigenschaften im endokrinen System zu. In der Maus führt IL-6 zu einer verstärkten Ausschüttung des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH), welches wiederum die Synthese der Glucocorticoide in der Nebennierenrinde initiiert [11, 12]. IL-6 spielt auch eine Rolle bei der Regulation des Glucose-Metabolismus. In der Ratten-Leber führt IL-6 zu einem verstärkten Abbau von Glycogen und zu einer verringerten mRNA-Expression der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK), welche ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese ist [13]. Im Menschen führt die subkutane Gabe von IL-6 zu einem Anstieg der Glucose-Konzentration im Blut [14]. Erhöhte IL-6 Konzentrationen im Blut stehen im Zusammenhang mit einigen Krankheiten wie Multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis [15-18]. Auch bei Krebserkrankungen wie dem Multiplen Myelom kommt IL-6 eine Bedeutung zu [19, 20]. Aufgrund seiner Rolle im endokrinen System und bei entzündlichen Krankheiten stellt IL-6 daher ein wichtiges Zielprotein für therapeutische Ansätze dar.

1.5 IL-6-induzierte Signaltransduktion

Zur Signalweiterleitung muss IL-6 zuerst an seinen spezifischen α -Rezeptor Glycoprotein 80 (gp80) binden. Nach der Rekrutierung und Homodimerisierung von gp130 kommt es zur Aktivierung des Jak/STAT-Signalwegs und der MAPK-Kaskade (zusammengefasst in [3]) (s. Abb. 2).

1.5.1 Jak/STAT-Signalweg

Interleukinrezeptoren besitzen keine intrinsische Kinase-Domäne oder andere Sequenzen mit katalytischer Funktion. Nach IL-6-Stimulation kommt es zur Aktivierung der gp130-assoziierten Tyrosinkinassen Jak1, Jak2 und Tyk2 [21, 22]. Diese Kinasen sind Mitglieder der Janus Kinase (Jak)-Familie und nach Auto- bzw. Transphosphorylierung in der Lage, Tyrosinreste im cytoplasmatischen Teil von gp130 zu phosphorylieren. Dieser Bereich enthält insgesamt sechs Tyrosine (Y683, Y759, Y767, Y814, Y905, Y915). Die vier membrandistalen Tyrosine sind nach der Phosphorylierung Erkennungsstellen für den Transkriptionsfaktor *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-3. Die phosphorylierten Tyrosine 905 und 915 dienen der Rekrutierung von STAT1 [22, 23]. Nach der Bindung an ihre Erkennungssequenz werden die STAT-Proteine durch die aktivierten Jaks an spezifischen Tyrosinresten phosphoryliert. Für STAT3 ist dies das Tyrosin 705 und für STAT1 das Tyrosin 701. Die Phosphorylierung ist Voraussetzung für die Homo- und Heterodimerisierung von STAT3 und/oder STAT1. Die dimerisierten STAT-Faktoren wandern in den Zellkern und binden dort an *Enhancer*-Bereiche in den Promotoren ihrer Zielgene und regulieren so deren Transkription [22].

1.5.2 MAPK-Kaskade

Nach der Phosphorylierung der cytoplasmatischen Tyrosine des gp130 durch die aktivierten Jaks, dient das Tyrosin 759 als Bindestelle für die Proteintyrosinphosphatase *SH2-domain-containing phosphatase* (SHP)-2 [24]. Diese Phosphatase fungiert als Adapterprotein und agiert nach Phosphorylierung durch Jak1 [25] mit dem Protein *growth-factor-receptor-bound protein* (Grb)-2, welches konstitutiv mit dem Guaninnukleotid-Austausch-Faktor *son of sevenless* (SOS) verbunden ist [24]. SOS überführt im Komplex mit Grb2 das membrangebundene

monomere G-Protein *retrovirus associated sequence* (Ras) in seine aktive, GTP-gebundene Form. Aktiviertes Ras ist nun in der Lage die MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) *Ras associated factor* (Raf)-1 durch Phosphorylierung zu aktivieren [26]. Raf-1 ist eine Serin/Threoninkinase und führt zur Aktivierung von MAP-Kinasen-Kinasen (MAPKK). Diese Serin/Threonin/Tyrosinkinasen wiederum aktivieren MAP-Kinasen (MAPK), welche in ihrer Funktion als Serin/Threoninkinasen bestimmte Transkriptionsfaktoren aktivieren und damit die Expression von Zielgenen steuern [27]. Neben den hier dargestellten Faktoren scheint auch dem Adapterprotein *Grb2-associated binder* (Gab)-1 eine Funktion bei der Regulation der MAPK-Kaskade zuzukommen [28, 29]. Seine Rolle ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Nach IL-6-Stimulation werden hauptsächlich die MAPKK MEK1/2 aktiviert, welche wiederum zur Aktivierung der MAPK *extracellular regulated kinase* (ERK)-1/2 führen. Diese Kinasen sind überwiegend an der Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt. Beispiele für ERK1/2-abhängige Transkriptionsfaktoren sind *ETS domain-containing protein Elk-1* (Elk-1) [30] und *CCAAT/enhancer-binding protein* (C/EBP), früher *nuclear factor-IL6* (NF-IL-6) genannt [31]. Welche Gene nach IL-6-Stimulation ERK1/2-abhängig exprimiert werden, ist noch nicht ausreichend geklärt.

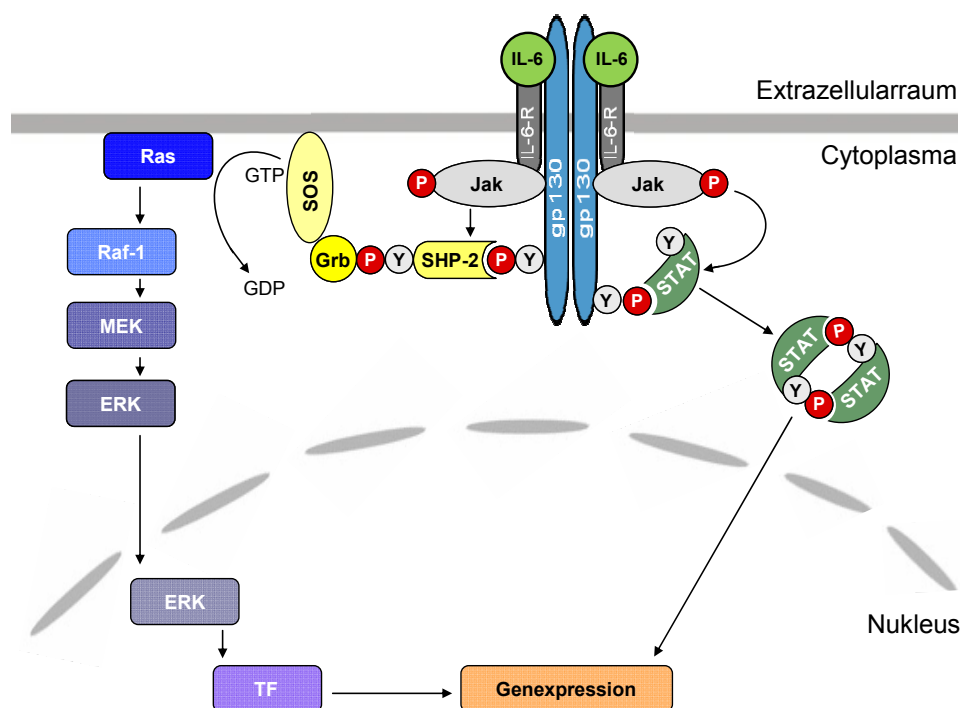


Abb. 2: IL-6-induzierte Signaltransduktion

1.6 Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion

Die IL-6-induzierte Signaltransduktion wird durch verschiedene Regulationsmechanismen kontrolliert. Zu den Negativregulatoren zählen Phosphatasen, *protein inhibitors of activated STATs* (PIAS) und *suppressor of cytokine signaling* (SOCS)-Proteine. Auch durch Endocytose von gp130 kann es zur Termination der Signaltransduktion kommen (zusammengefasst in [3]).

1.6.1 Phosphatasen

Der Proteintyrosinphosphatase SHP-2 kommt neben ihrer Rolle als Adapterprotein in der MAPK-Kaskade auch eine Funktion in der Negativregulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion zu (zusammengefasst in [3]). SHP-2 wird ubiquitär exprimiert und besteht aus zwei N-terminalen SH2-Domänen und einer zentralen katalytischen Phosphatase-Domäne. Die Aktivität der SHP-2 wird durch die äußere N-terminale SH2-Domäne reguliert, da diese in Abwesenheit eines Tyrosin-phosphorylierten Bindungspartners die katalytische Domäne von SHP-2 blockiert [32, 33]. SHP-2 kann an das phosphorylierte Tyrosin 759 des gp130-Rezeptors binden [25, 34, 35]. Durch Bindung der SH2-Domänen an Phosphotyrosinmotive wird SHP-2 enzymatisch aktiv [36-38]. Neben der Interaktion mit gp130 wurde gezeigt, dass SHP-2 auch an Jak1, Jak2 und Tyk2 sowie an STAT3 binden kann [25, 39, 40], wodurch diese potentielle Substrate für SHP-2 sein können.

Neben SHP-2 spielen noch weitere Phosphatasen eine Rolle in der Negativregulation des Jak/STAT-Signalwegs. Beispiele sind *protein tyrosine phosphatase 1B* (PTP1B) [41], CD45 [42] und SHP-1 [43] sowie die nukleäre Proteintyrosinphosphatase *T-cell protein tyrosine phosphatase* (TC-PTP) [44]. Die genaue Funktion dieser Phosphatasen nach IL-6-Stimulation ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt.

1.6.2 PIAS-Proteine

Die Familie der PIAS-Proteine besteht aus den fünf Mitgliedern PIAS1, PIAS3, PIASx α , PIASx β , und PIASy. PIAS-Proteine können nur an aktivierte, d. h. Tyrosin-phosphorylierte STAT-Faktoren binden. Als Inhibitor der STAT3-vermittelten Genexpression nach IL-6-Stimulation fungiert PIAS3, indem es die Bindung von

STAT3 an die DNA verhindert [45]. Darüber hinaus können PIAS-Proteine auch als E3-Sumo-Ligase fungieren und so durch Sumoylierung die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflussen [46, 47]. Die genaue Funktion der einzelnen PIAS-Proteine und ihre Relevanz in der Negativregulation der Jak/STAT-Signaltransduktion ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

1.6.3 SOCS-Proteine

Die SOCS-Proteine sind klassische *feedback*-Inhibitoren, da ihre Expression durch die Signalwege induziert wird, die sie selbst wiederum hemmen. Zur SOCS-Familie gehören die acht Mitglieder SOCS1-7 und *cytokine-inducible SH2-containing protein* (CIS). SOCS-Proteine bestehen aus einer N-terminalen *kinase inhibitory region* (KIR), einer zentralen SH2-Domäne und einer C-terminalen SOCS Box (s. Abb. 3). IL-6 induziert über den Jak/STAT-Signalweg vor allem SOCS3 [48-50]. Dieses bindet wie SHP-2 an das phosphorylierte Tyrosin 759 des gp130-Rezeptors, ist in seiner Aktivität jedoch unabhängig von der Phosphatase [23]. Über die KIR-Domäne können die SOCS-Proteine mit den Jaks interagieren und führen dadurch zu einer verringerten Phosphorylierung der Jaks [51, 52]. Die SOCS-Proteine führen so zu einer Hemmung der IL-6-vermittelten Signaltransduktion.

Neben ihrer Rolle als *feedback*-Inhibitoren sind SOCS-Proteine auch an dem proteasomalen Abbau von Proteinen beteiligt. Sie fungieren als E3-Ligase im Komplex mit Elongin B und C, *RING box protein* (Rbx)-1 und Cullin (Cul)-5 [53, 54]. SOCS3 führt z. B. zur ubiquitin-abhängigen Degradation von *insulin receptor substrate* (IRS)-1 und 2 [55]. Über die Interaktion mit Elongin C wird aber auch der proteasomale Abbau von SOCS3 selbst reguliert. Dabei spielen die C-terminalen Tyrosine 204 und 221 in der SOCS Box eine wichtige Rolle, da nach Jak2-vermittelter Phosphorylierung dieser Tyrosine die Interaktion zwischen SOCS3 und Elongin C aufgehoben wird und sich die Halblebenszeit von SOCS3 verkürzt [56].

Neuere Studien belegen, dass SOCS-Proteine auch eine Funktion im Zellkern zu haben scheinen. Haffner et al. [57] konnten zeigen, dass SOCS1 im Komplex mit dem aktivierten Glucocorticoid-Rezeptor in den Zellkern transloziert. Gaudy et al. [58] konnten zeigen, dass SOCS3 die Proteinkinase A (PKA)-vermittelte Phosphorylierung von *cAMP response element-binding protein* (CREB) im Nukleus

verhindert. Die genaue Funktion von SOCS-Proteinen im Zellkern ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

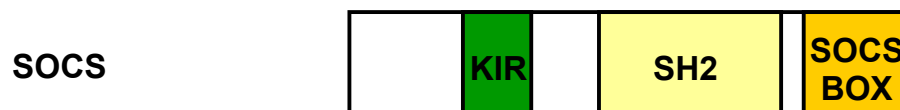


Abb. 3: Strukturelle Organisation von SOCS-Proteinen

1.7 Glanduläre Hormone

Glanduläre Hormone werden in endokrinen Drüsen gebildet und häufig in Form von Vorstufen gespeichert, bevor sie zu ihren Zielzellen transportiert werden. Glanduläre Hormone können Polypeptide, Aminosäure-Derivate oder Steroide sein.

1.7.1 Glucocorticoide

Glucocorticoide gehören zur Klasse der Steroidhormone und werden in der Nebennierenrinde produziert. Ausgangsstoff zur Bildung aller Glucocorticoide ist das Cholesterin, das beim Menschen hauptsächlich über die Nahrung aufgenommen wird. Die Synthese der Glucocorticoide steht unter der Kontrolle der hormonellen Achse vom Hypothalamus über die Hypophyse bis zur Nebennierenrinde und wird durch die Ausschüttung von ACTH eingeleitet. Die Ausschüttung von ACTH wird über einen zirkadianen Rhythmus gesteuert, der bewirkt, dass die Konzentration von Glucocorticoiden am Morgen hoch und am Abend niedrig ist. Zusätzlich zum zirkadianen Rhythmus kann die Ausschüttung von ACTH auch durch Stress induziert werden. Der Abbau der Glucocorticoide findet in der Leber statt, die Ausscheidung erfolgt überwiegend renal.

Glucocorticoide haben vielfältige metabolische und antiinflammatorische Eigenschaften. Sie fördern die Gluconeogenese in Leber und Niere, führen zum Abbau von Proteinen im Muskel und steigern die Lipolyse sowie die Glykogensynthese im Fettgewebe.

Die antiinflammatorischen Eigenschaften von Glucocorticoiden führen zu einer verringerten Freisetzung von Leukotrienen und Prostaglandinen sowie einer verminderten T-Zell-Aktivität. Der dadurch erzielten antiallergischen und

immunsuppressiven Wirkung von Glucocorticoiden wird sich in der therapeutischen Behandlung von entzündlichen Krankheiten, wie beispielsweise Asthma, rheumatoider Arthritis oder Morbus Crohn zunutze gemacht. Ein Beispiel für ein klinisch genutztes synthetisches Glucocorticoid ist Dexamethason. Es unterscheidet sich vom natürlichen Cortisol durch eine zusätzliche Methylgruppe und eine eingefügte Fluorgruppe, was die Halblebenszeit des Medikaments im Körper verlängert (s. Abb. 4). Neben ihrer dienlichen Funktion als Therapeutikum sind jedoch auch zahlreiche Nebenwirkungen von Glucocorticoiden bekannt, wie das Cushing-Syndrom oder eine erhöhte Infektionsanfälligkeit des Patienten.

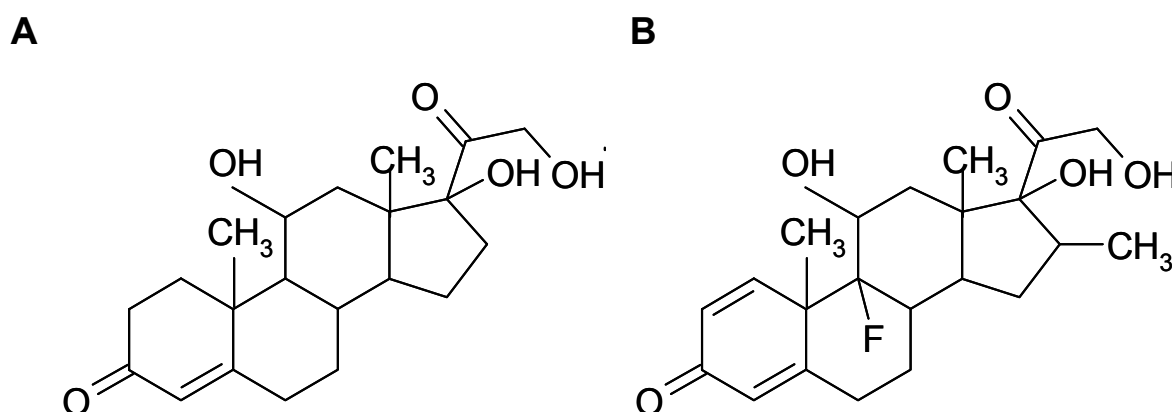


Abb. 4: Strukturformel von Cortisol (A) und Dexamethason (B)

1.7.1.1 Glucocorticoid-induzierte Signaltransduktion

Glucocorticoide signalisieren über einen Glucocorticoid-Rezeptor (GR), der zur Klasse der nukleären Rezeptoren gehört. Der Glucocorticoid-Rezeptor besteht aus einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD), einer zentralen DNA-Bindedomäne (DBD) sowie im C-terminalen Bereich aus einer Liganden-Bindedomäne (LBD) und einer weiteren TAD (s. Abb. 5).

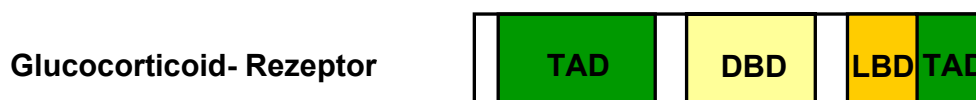


Abb. 5: Strukturelle Organisation des Glucocorticoid-Rezeptors

In Abwesenheit eines Liganden liegt der Rezeptor in einer inaktiven Form im Cytoplasma vor, wobei er u.a. an die Hitzeschock-Proteine hsp70, hsp90 sowie an Immunophilin (IP) gebunden ist. Nach Bindung eines Glucocorticoids (G) an den Rezeptor findet eine Konformationsänderung des Rezeptors statt, wobei eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) freigelegt wird (zusammengefasst in [59]). Es kommt zur Translokation in den Zellkern, wo Glucocorticoide die Expression von Genen auf zwei Wegen beeinflussen können (s. Abb. 6). Im ersten Fall binden aktivierte dimerisierte Rezeptoren über ihre DNA-Bindedomäne an *glucocorticoid response elements* (GRE) im Promotorbereich ihrer Zielgene und führen überwiegend zur Induktion der Genexpression. Diesen Mechanismus nennt man „Transaktivierung“. Im zweiten Fall bindet der aktivierte Glucocorticoid-Rezeptor vermutlich als Monomer an andere Transkriptionsfaktoren (TF) und wirkt hauptsächlich repressorisch auf die Genexpression. Dieser „Transrepression“ genannte Vorgang benötigt keine GREs im Promotorbereich der Zielgene (zusammengefasst in [59]).

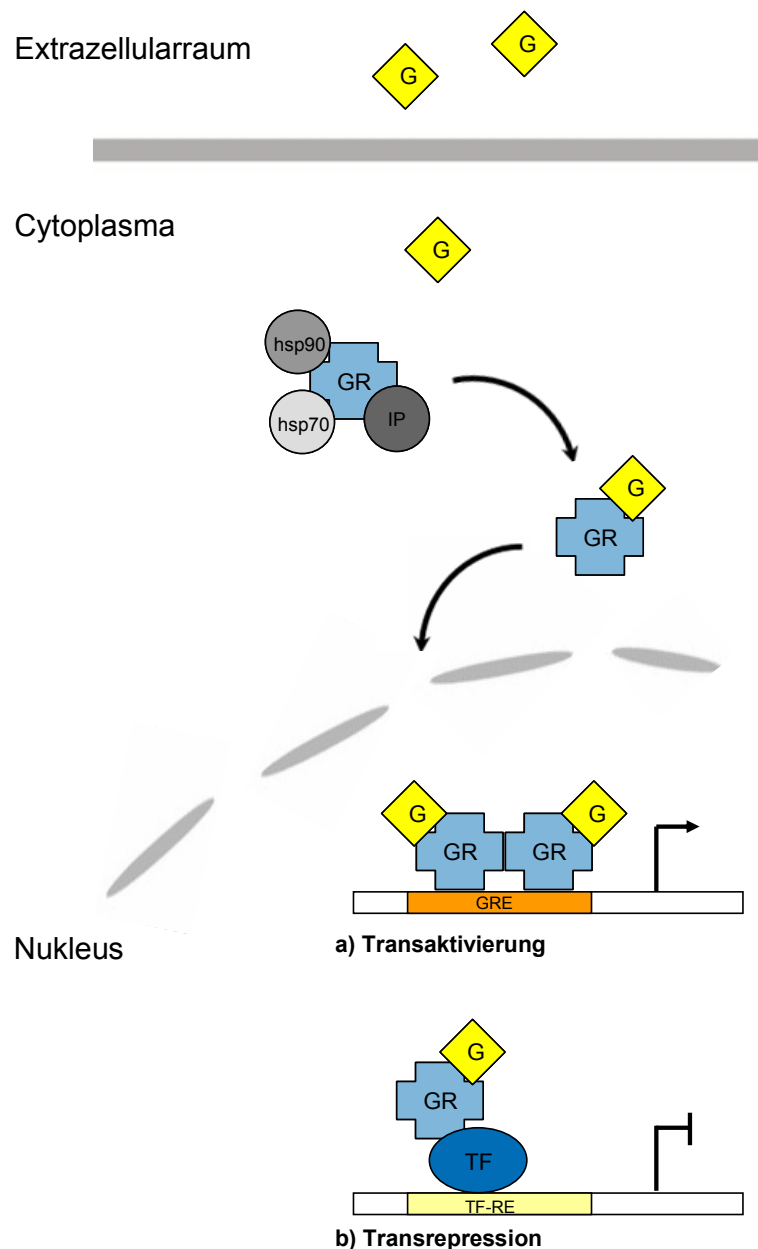


Abb. 6: Glucocorticoid-induzierte Signaltransduktion

1.7.1.2 Wechselwirkung von Glucocorticoiden mit anderen Signalwegen

Glucocorticoide haben breite antiinflammatorische Eigenschaften, die sich auch auf Ebene der Genexpression widerspiegeln. Durch Transaktivierung führen Glucocorticoide z. B. zur Expression des antiinflammatorischen Cytokins IL-10 [60]. Zusätzlich können Glucocorticoide durch ihre transrepressorische Wirkung auf andere Transkriptionsfaktoren die Expression proinflammatorischer Gene hemmen. Besonders die Transkriptionsfaktoren *nuclear factor (NF)-κB* und *activator protein*

(AP)-1 sind an der Expression proinflammatorischer Gene, wie den Cytokinen IL-6 und *tumor necrosis factor* (TNF)- α , beteiligt [61, 62]. Es konnte von mehreren Forschergruppen gezeigt werden, dass Glucocorticoide die Aktivität von NF- κ B und AP-1 beeinträchtigen. Beispielsweise kann der Glucocorticoid-Rezeptor die NF- κ B-Untereinheit p65 komplexieren und dadurch die NF- κ B-abhängige Genexpression reprimieren [63-65]. Gleiches gilt für die AP-1-Untereinheiten c-Fos und c-Jun [66]. Darüber hinaus führen Glucocorticoide zu einer verstärkten Synthese des Inhibitors I κ B- α , der NF- κ B in einer inaktivierten Form im Cytoplasma zurückhält [67, 68].

Gut untersucht ist auch die Interaktion von Glucocorticoiden mit STAT-Faktoren. Im Gegensatz zur Wechselwirkung mit NF- κ B und AP-1 resultiert die Kombination aus Glucocorticoid-Rezeptor und STAT-Faktor in einer verstärkten STAT-abhängigen Genexpression. Ein Beispiel ist die STAT5-abhängige β -Casein Expression, die durch die Interaktion des Glucocorticoid-Rezeptors mit STAT5 weiter verstärkt wird [69]. Ebenso wird die STAT3-abhängige α 2-Macroglobulin Expression nach Glucocorticoid-Behandlung durch Ausbildung eines *enhanceosomes*, bestehend aus *octamer-binding protein* (Oct)-1, c-Jun/c-Fos, STAT3 und dem Glucocorticoid-Rezeptors deutlich stärker induziert als ohne Glucocorticoid-Behandlung [70].

Glucocorticoide können auch über Wechselwirkungen mit Kinasen und Phosphatasen Einfluss auf die Genexpression nehmen. Es wurde gezeigt, dass der Glucocorticoid-Rezeptor an die MAP Kinase *c-Jun N-terminale kinase* (JNK) binden kann, wodurch deren Aktivität gehemmt wird [71]. Glucocorticoide können außerdem die Synthese der *dual specificity phosphatase* (DUSP)-1 induzieren [72]. Diese Phosphatase kann ERK, p38 und JNK dephosphorylieren und diese dadurch inaktivieren [73].

Die aufgeführten Beispiele zeigen, dass Glucocorticoide vielfältigen Einfluss auf andere Signalkaskaden nehmen. Daher ist es wichtig, die molekularen Mechanismen von Glucocorticoiden zu kennen und genauer zu untersuchen.

1.7.2 Glucagon

Glucagon ist ein Polypeptid aus 29 Aminosäuren, das in den α -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas' gebildet wird. Seine Vorstufe ist das Prä-Proglucagon, welches durch spezifische Konvertasen schließlich zu Glucagon

prozessiert wird. Im Körper ist Glucagon ein Antagonist des Insulins und für die Aufrechterhaltung der Glucosefreisetzung aus der Leber verantwortlich. Kommt es zu einem Abfall der Glucose-Konzentration im Blut, wird Glucagon aus dem Pankreas sekretiert und endokrin zur Leber transportiert. Weitere Stimuli, die zur Ausschüttung von Glucagon führen, sind proteinreiche Mahlzeiten und Stress.

In der Leber aktiviert Glucagon Enzyme der Gluconeogenese wie Glucose-6-Phosphatase (G-6-P) [74] und PEPCK [75]. Zusätzlich zur Gluconeogenese stimuliert Glucagon die Glycogenolyse, u. a. über Aktivierung der Glycogen Phosphorylase [76]. Durch Einleiten der Gluconeogenese und der Glycogenolyse kommt es zur Erhöhung der Glucose-Konzentration im Blut, wodurch einem Blutzuckerabfall vorgebeugt wird. Die Inaktivierung von Glucagon erfolgt durch Spaltung in der Leber.

1.7.2.1 Glucagon-induzierte Signaltransduktion

Glucagon signalisiert über einen G-Protein gekoppelten Siebentransmembranrezeptor (GluR), der hauptsächlich auf Leberzellen exprimiert wird, aber auch auf Nierenzellen, im Gastrointestinaltrakt, im Fettgewebe und im Gehirn vorkommt. Die assoziierten heterotrimeren G-Proteine, die sich aus einer α -, β - und γ -Untereinheit zusammensetzen, sind vom G_s - und G_q -Typ (s. Abb. 7). Im inaktiven Zustand ist die α -Untereinheit mit einem GDP verbunden. Nach Glucagon-Stimulation kommt es durch Konformationsänderung zur Aktivierung der α -Untereinheit, wobei das GDP durch ein GTP ersetzt wird. Die α -Untereinheit des G_s -Proteins dissoziiert von der β - und γ -Untereinheit und aktiviert die Adenylatzyklase (AZ). Die aktivierte Adenylatzyklase konvertiert ATP zu cAMP und erhöht dadurch die intrazelluläre Konzentration dieses *second messenger*-Moleküls. cAMP aktiviert die PKA, welche unter anderem den Transkriptionsfaktor CREB phosphoryliert, was zur Expression cAMP-abhängiger Gene führt. Zusätzlich führt Glucagon über die α -Untereinheit des G_q -Proteins zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC)- β . Neueren Forschungsergebnissen zufolge kommt auch der β/γ -Untereinheit des G_q -Proteins eine Rolle bei der Aktivierung von PLC β zu (zusammengefasst in [77]). Die aktivierte PLC β hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃). IP₃ wirkt auf intrazelluläre Kalziumkanäle, was zur Erhöhung des Kalziumspiegels in der Zelle führt. Kalzium ist wie cAMP ein

second-messenger-Molekül. Es führt u.a. zur Aktivierung von Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (PKCam), welche die Glykogensynthese durch Inaktivierung der Glykogen-Synthase beeinflussen können. Bei der Negativregulation der Glucagon-induzierten Signaltransduktion spielen vor allem Phosphodiesterasen eine Rolle, die cAMP zu 5'-AMP spalten und damit inaktivieren.

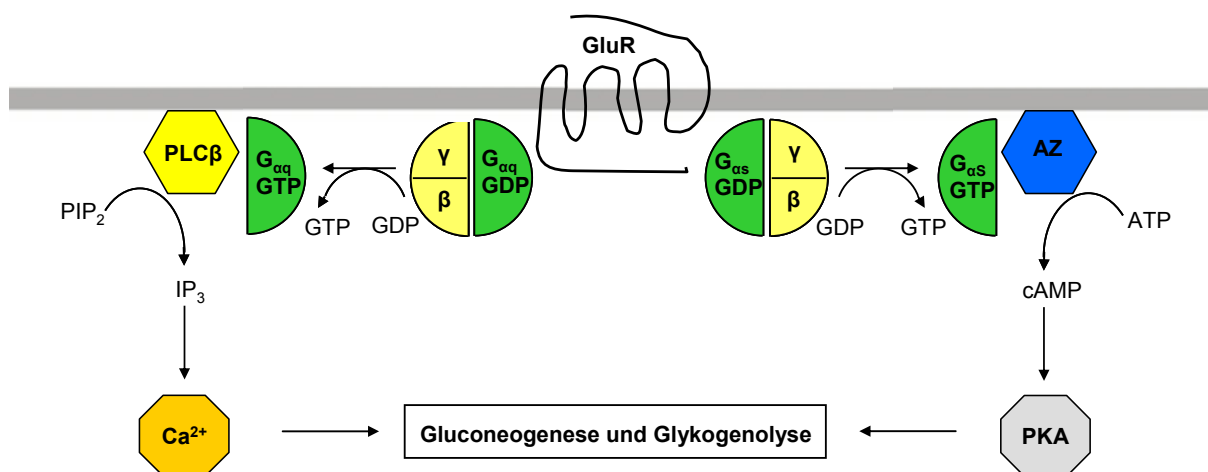


Abb. 7: Glucagon-induzierte Signaltransduktion

1.7.2.2 Wechselwirkung von cAMP mit anderen Signalwegen

Die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren führt zur Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Zelle. Neben Peptidhormonen, wie Glucagon, signalisieren auch Amine, wie Adrenalin, oder Neuropeptide, wie Vasopressin, über diese Klasse von Rezeptoren. cAMP ist damit ein sehr vielfältiges *second-messenger*-Molekül, das verschiedene Prozesse im Körper steuert und auch Einfluss auf andere Signalkaskaden nehmen kann.

Intensiv untersucht ist die Wechselwirkung von cAMP und Wachstumsfaktoren. Je nach Zelltyp kann cAMP die Proliferation von Zellen entweder hemmen oder stimulieren. Dies geschieht durch Modulation der durch Wachstumshormone aktivierten MAPK-Kaskade. In Endothelzellen und in Zellen der glatten Muskulatur führt eine Erhöhung des cAMP-Levels zu einer Inhibition der MAPK-Kaskade nach Stimulation mit *vascular endothelial growth factor* (VEGF) bzw. *epidermal growth factor* (EGF) [78-80]. Im Gegensatz dazu aktiviert cAMP die MAPK-Kaskade in PC12 Zellen, in Zellen der Schilddrüse und in Zellen der Hypophyse [81-83]. Die

molekularen Mechanismen, die der Wirkung von cAMP auf die MAPK-Kaskade zugrunde liegen, sind sehr vielfältig. Abb. 8 gibt einen Überblick über einige der Regulationsmethoden, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

cAMP führt zur Aktivierung des GTP-Austauschfaktors Epac und der PKA. Beide Proteine sind in der Lage, die GTPase *RAS-related protein* (Rap)-1 zu aktivieren, wobei die Phosphorylierung von Rap1 durch PKA entweder direkt oder indirekt über die Kinase Src verläuft [84-86]. Je nach Zelltyp führt die Aktivierung von Rap1 zur Inhibition oder Aktivierung der MAPK-Kaskade. Mehreren Studien zur Folge ist die Serin/Threonin-Proteinkinase B-Raf, die im Gegensatz zu Raf-1 nicht ubiquitär exprimiert wird, entscheidend für die Art der Regulation durch Rap1 [87-89]. In B-Raf-negativen Zellen bindet aktiviertes Rap1 an Raf-1, wodurch die Signalweiterleitung der MAPK-Kaskade unterbrochen wird [90]. In B-Raf-positiven Zellen kommt es trotz der Inhibition von Raf-1 zur Aktivierung von ERK1/2, da B-Raf die Rolle von Raf-1 in der MAPK-Kaskade substituieren kann. B-Raf wird dabei nicht von Ras, sondern von Rap1 aktiviert [91]. Neben der Regulation durch Rap1 kann die PKA auch selbst Einfluss auf die MAPK-Kaskade nehmen. Es konnte gezeigt werden, dass die PKA Raf-1 an den inhibitorischen Serinen 43, 259 und 621 phosphorylieren kann, wodurch es zu einer Inhibition der Signalweiterleitung kommt [92-94].

Im Gegensatz zur Wechselwirkung von cAMP mit Wachstumsfaktoren ist die Interaktion von cAMP mit Interleukinen noch weitgehend unerforscht. Sobota et al. [95] konnten zeigen, dass Prostaglandin E1 die IL-6-induzierte MAPK-Kaskade in Fibroblasten inhibiert. Darüber hinaus weisen erste Studien darauf hin, dass cAMP auch mit dem Jak/STAT-Signalweg interagieren kann, da cAMP den *feedback*-Inhibitor SOCS3 induziert [58, 96]. In HUVEC-Zellen führt die cAMP-abhängige SOCS3-Expression zu einer reduzierten IL-6-induzierten STAT3- und ERK1/2-Phosphorylierung [96, 97].

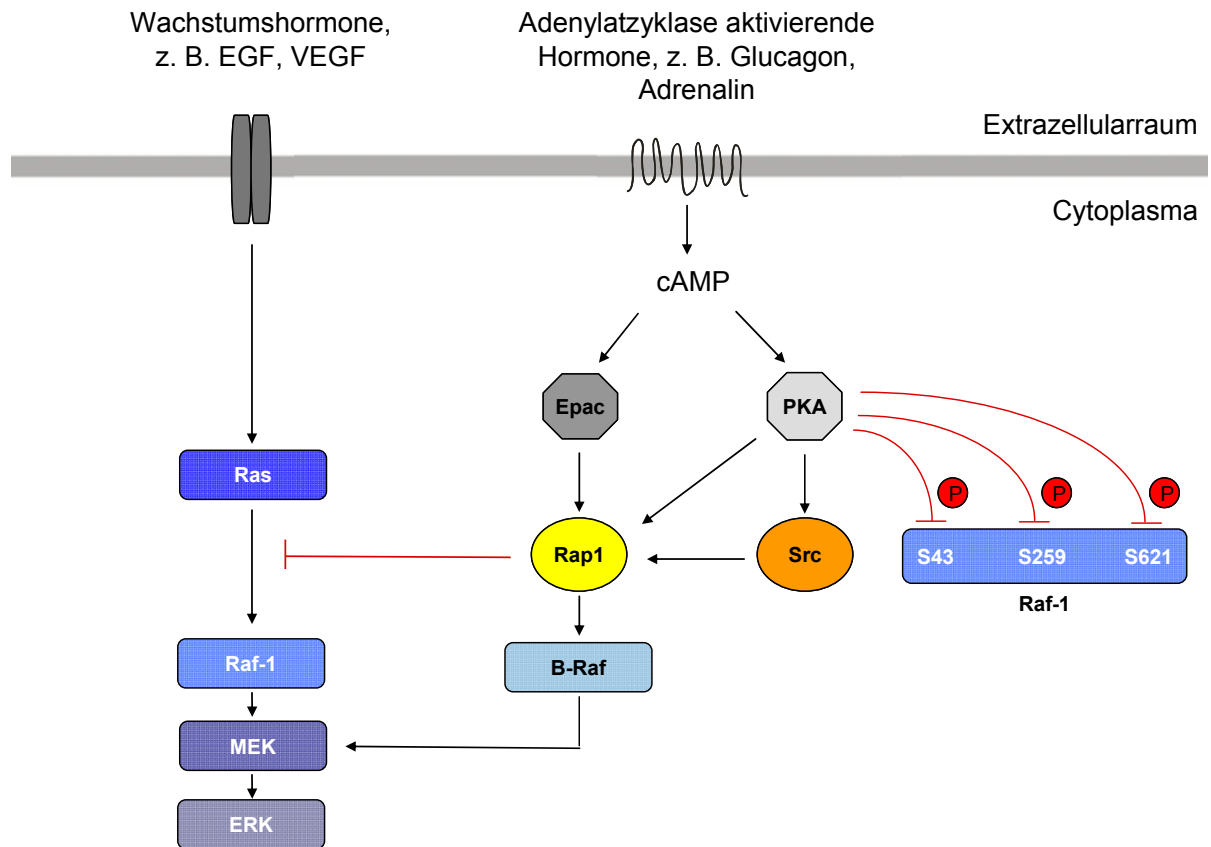


Abb. 8: Wechselwirkung von cAMP mit der MAPK-Kaskade

1.8 Ziele der Arbeit

IL-6 spielt als Induktor der Akutphase-Proteinexpression eine wichtige Rolle bei Entzündungen und entzündlichen Krankheiten. In der Therapie von entzündlichen Krankheiten, wie bspw. Morbus Crohn oder rheumatoider Arthritis, finden Glucocorticoide und ihre synthetischen Derivate, wie Dexamethason, aufgrund ihrer stark antiinflammatorischen Eigenschaften breite Anwendung. Die Behandlung mit Glucocorticoiden kann jedoch auch zu zahlreichen Nebenwirkungen führen, wie z. B. einer erhöhten Infektionsanfälligkeit des Patienten oder zum Cushing Syndrom. Die molekularen Mechanismen der Wechselwirkungen von IL-6 und Glucocorticoiden im Zuge einer Entzündung sind bisher nur unzureichend erforscht. Im ersten Teil dieser Arbeit soll daher die Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch Glucocorticoide untersucht werden.

IL-6 kommt neben seiner Funktion als Induktor der Akutphase-Proteinexpression auch eine Rolle bei der Regulation des Glucose-Metabolismus zu [13, 14]. Ein weiterer wichtiger Regulator der Glucose-Homöostase ist Glucagon, ein Gegenspieler des Insulins. Eine verlängerte Akutphase-Reaktion, die in einem septischen Schock resultieren kann, ist u. a. durch eine verstärkte Ausschüttung von IL-6 und Glucagon gekennzeichnet, was im Zusammenhang mit einer Störung des Glucose-Gleichgewichts steht [98]. Auch die vornehmlich bei Krebserkrankungen auftretende Kachexie, eine Stoffwechselstörung, die zur Abmagerung führt, steht im Zusammenhang mit erhöhten IL-6- und Glucagon-Konzentrationen (zusammengefasst in [99]). Die molekularen Mechanismen der Wechselwirkungen von IL-6 und Glucagon sind kaum erforscht. Im zweiten Teil dieser Arbeit soll daher die Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch Glucagon untersucht werden.

2 Material und Methoden

Material und Methoden sind nach Standardprotokollen des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie, RWTH Aachen, verfasst und entsprechend individueller experimenteller Änderungen modifiziert.

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in der Qualität *pro analysi* eingesetzt und von den Firmen wie angegeben bezogen.

2.1.1 Stimulanzen

6-Phe-cAMP	(Biolog, Bremen, Deutschland)
8-pCPT-2'-O-Me-cAMP	(Biolog)
Dexamethason	(Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
Doxycyclin	(Sigma Aldrich)
Erythropoetin	(freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Roche, Grenzach, Deutschland)
Forskolin	(Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)
Glucagon	(Sigma Aldrich)
Ionomycin	(Calbiochem)
RU-486	(Sigma Aldrich)
ZK-216348	(freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von der Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Deutschland)

2.1.2 Inhibitoren

Actinomycin D	(Calbiochem)
Cycloheximid	(Calbiochem)
KT-5720	(Calbiochem)
U0126	(Promega, Madison, WI, USA)
U73122	(Sigma Aldrich)

2.2 Cytokine

IL-6	Eigenherstellung nach der Methode von Arcone [100]
gp-80 (sIL-6R)	Eigenherstellung nach der Methode von Weiergräber [101]

2.3 Antikörper

α -CREB (86B10)	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen CREB (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland)
α -(p)S133 CREB (8763)	monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen Serin 133 phosphoryliertes CREB (New England Biolabs)
α -ERK1 (C-10)	polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen ERK1 (Santa Cruz Technologies, Santa Cruz, CA, USA)
α -ERK2 (C-14)	polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen ERK2 (Santa Cruz Technologies)
α -(p)Threonin 202/ Tyrosin 204 p42/44	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen Threonin 202 und Tyrosin 204 phosphorylierte ERK1/2 (New England Biolabs)
α -GAPDH (6C5)	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen GAPDH (Santa Cruz Technologies)
α -GR (M-20)	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen den Glucocorticoid-Rezeptor (Santa Cruz Technologies)
α -HSP70 (N27F34)	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen HSP70 (Stressgen Biotechnology, Victoria British Columbia, Kanada)
α -Lamin A/C	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen Lamin A/C (BD Transduction Laboratories, Heidelberg, Deutschland)

α -Rap1 (121)	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen Rap1 (Santa Cruz Technologies)
α -SOCS3 (M-20)	polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen SOCS3 (Santa Cruz Technologies)
α -STAT3 (C-20)	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen STAT3 (Santa Cruz Technologies)
α -(p)Y STAT3	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen Y705 phosphoryliertes STAT3 (Santa Cruz Technologies)
α -Tubulin	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen α -Tubulin (Sigma Aldrich)
Esel- α -Kaninchen-Cy2	polyklonaler Antikörper gegen den konstanten Bereich des Kaninchen Immunglobulins (Ig), konjugiert an <i>cyanine dye</i> (Cy)-2 (Jackson Immunolab, Suffolk, Großbritannien)
Kaninchen- α -Ziege-HRP	polyklonaler Antikörper gegen den konstanten Bereich des Ziege Ig, konjugiert an <i>horseradish peroxidase</i> (HRP) (DAKO, Glostrup, Dänemark)
Ziege- α -Kaninchen-HRP	polyklonaler Antikörper gegen den konstanten Bereich des Kaninchen Ig, HRP-konjugiert (DAKO)
Ziege- α -Maus-HRP	polyklonaler Antikörper gegen den konstanten Bereich des Maus Ig, HRP-konjugiert (DAKO)

2.4 Plasmide

pCR©3 lacZ	Vektorkonstrukt, welches die β -Galaktosidase unter der Kontrolle des CMV-Promotors codiert.
pGL3 α 2M luc	Vektorkonstrukt, welches die Leuchtkäfer-Luziferase unter der Kontrolle des α 2M-Promotors (-215 bis +27) codiert
pGL3 FGG luc	Vektorkonstrukt, welches die Leuchtkäfer-Luziferase unter der Kontrolle des FGG-Promotors (-3799 bis +37) codiert.

pGL3 SOCS3 luc	Vektorkonstrukt, welches die Leuchtkäfer-Luziferase unter der Kontrolle des SOCS3-Promotors (-511 bis +929) codiert.
pcDNA5/FRT/TO STAT3α-CFP	Vektorkonstrukt, welches STAT3α fusioniert an <i>cyan fluorescent protein</i> (CFP) unter der Kontrolle des CMV-Promotors codiert.
EpoR/gp130 6Y	Vektorkonstrukt, welches den chimären Erythropoetin/gp130-Rezeptor unter der Kontrolle des CMV-Promotors codiert. Der extrazelluläre Teil besteht aus dem murinen Erythropoetin-Rezeptor und der transmembrane und cytoplasmatische Teil aus dem humanen gp130-Rezeptor.
EpoR/gp130 FY4F	Vektorkonstrukt, welches EpoR/gp130 6Y entspricht, wobei die Tyrosine 683, 767, 814, 905 und 915 des gp130-Rezeptors zu Phenylalanin mutiert sind.
pGex-RalGDS RBD	Vektorkonstrukt, welches für die Rap1-bindende Domäne (RBD) des Proteins RalGDS (788 – 884) codiert. Das Konstrukt ist C-terminal an Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert.
pTet-HA-huSOCS3	Vektorkonstrukt, welches humanes SOCS3 unter Kontrolle des CMV-Promotors codiert. Die Expression ist reguliert durch ein <i>tet-off</i> -System, so dass nur in Abwesenheit von Doxycyclin Protein gebildet wird.
pTet-Off	Vektorkonstrukt, welches den <i>tet</i> -Repressor unter Kontrolle des CMV-Promotors codiert.

2.5 Prokaryontische Zellen

Zur Amplifizierung von Plasmid DNA sowie der Expression eukaryontischer Proteine wurden *E.coli* Bakterien verwendet.

E.coli XL-10 (Agilent, Santa Clara, CA, USA)

E.coli BL-21 (Agilent)

2.5.1 Amplifizierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurden Bakterien des Stammes *E.coli* XL10 verwendet. Die Kultivierung erfolgte schüttelnd in LB-Flüssigmedium bei 37°C unter Zugabe von Ampicillin [100 µg/ml]. Zur Langzeitlagerung der rekombinanten Bakterien wurden diese im Verhältnis 1:1 mit 87% Glycerin versetzt und anschließend bei -80°C tiefgefroren.

Zur Aufreinigung der amplifizierten Plasmid-DNA wurde das *HiSpeed® Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die Plasmid-DNA wurde in 500 µl *H₂O Merck* (Merck, Darmstadt, Deutschland) eluiert und die Konzentration photometrisch am Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) über die OD₂₆₀ bestimmt. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

LB-Flüssigmedium

5 g/l	NaCl
5 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	Bactotrypton
10 mM	Tris/HCl pH 8,0
1 mM	MgSO ₄

2.5.2 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur bakteriellen Expression von GST-Fusionsproteinen wurden Bakterien des Stammes *E.coli* BL-21 verwendet. Mithilfe einer Stammkultur wurde eine Vorkultur in 50 ml LB-Flüssigmedium, versetzt mit Ampicillin [100 µg/ml], angeimpft, die über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert wurde. Mit der Vorkultur wurde eine Hauptkultur

in 500 ml LB-Flüssigmedium, versetzt mit Ampicillin [100 µg/ml], angeimpft, die bis zu einer OD₅₅₀ von 0,6 – 0,8 bei 37 °C wachsen gelassen wurde. Nach Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurde mit 1 mM IPTG (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) die Expression des Fusionsproteins induziert und die Bakterienkultur für weitere sechs Stunden bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert.

Für den Zellaufschluss wurde die Hauptkultur für 15 Minuten bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 10 ml E.coli Lysepuffer, versetzt mit einer Spatelspitze Lysozym (Sigma Aldrich), aufgenommen. Nach einsetzender Viskosität der Zellsuspension wurde durch Ultraschall-Behandlung (Sonifier, Stufe 3-4, 30 % Intervalle; Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CT, USA) die Bakterien-DNA geschert. Die Suspension wurde für 15 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen und steril filtriert (0,22 µm-Filter; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)

Zur Aufreinigung des GST-Fusionsproteins wurde Glutathion-Sepharose (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet. Diese wurde zunächst nach Anleitung des Herstellers äquilibriert. Die Sepharose wurde mit dem steril filtrierten Überstand für 30 Minuten bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde für fünf Minuten bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Die pelletierte GST-Sepharose wurde 3 x mit PBS gewaschen und auf eine Chromatographie Tropfsäule (BioRAD, München, Deutschland) gegeben. Die Elution des an die GST-Sepharose gebundenen Zielproteins erfolgte mit einem Elutionspuffer, der einen Überschuss an reduziertem Glutathion beinhaltete.

E.coli Lysepuffer

10 mM Hepes pH 8.0

1 mM EDTA

150 mM NaCl

1 mM DTT

Proteaseinhibitoren (frisch zugegeben):

5 mg/ml Pepstatin (Merck)

5 mg/ml Leupeptin (Sigma)

10 mg/ml Aprotinin (MP Biomedicals)
 100 mM Pefablock (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Elutionspuffer

10 mM Hepes pH 8.0
 250 mM NaCl
 1 mM DTT
 1 mM EDTA
 10 mM Glutathion

2.6 Eukaryontische Zelllinien

HepG2	adhärent wachsende humane Hepatom-Zelllinie aus der Leber (DSMZ, Braunschweig, Deutschland; ATCC, Manassas, VA, USA)
MEF	adhärent wachsende murine, embryonale Fibroblasten Zelllinie (DSMZ; ATCC)
MEF Δ/Δ SOCS3	adhärent wachsende murine, embryonale Fibroblasten Zelllinie mit einem SOCS3- <i>Knock out</i> (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Prof. Akihiko Yoshimura, Kyushu Universität, Fukuoka, Japan)

2.6.1 Nährmedien und Lösungen

DMEM Flüssigmedium mit 4,5 g/l Glucose	(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
DMEM + F12 Flüssigmedium mit 4,5 g/l Glucose	(Life Technologies)
FKS (mykoplasmafreies fötales Kälberserum)	(PAA, Pasching, Österreich)
Penicillin/Streptomycin	(Life Technologies)
Trypsin/EDTA	(Biochrom, Berlin, Deutschland)
DMSO	(Merck)

2.6.2 Kultivierung

Die HepG2-Zellen wurden in DMEM + F12 Flüssigmedium mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin in wassergesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die MEF-Zellen wurden in DMEM Flüssigmedium mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin in wassergesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 10 % CO₂ kultiviert. Bei konfluenter Bewachung wurden die Zellen von der Platte abgelöst und neu verteilt. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Um die adhärent wachsenden Zellen von der Petrischale zu lösen, wurde 1 ml Trypsin/ EDTA zugegeben und die Zellen 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder in Kulturmedium aufgenommen und 2 x 10⁶ Zellen pro 10 cm Petrischale ausgesät. Die HepG2-Zellen wurden vor dem Aussähen in einer Spritze mit einer Kanüle von 0,9 mm x 40 mm einmal aufgezogen, um die beim Wachstum entstandenen Zellkonglomerate zu lösen.

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden Zellen mit einer Dichte von 70-80 % zunächst mit 1 ml Trypsin/ EDTA von der Petrischale abgelöst und anschließend wieder in Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 1000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in FKS + 10 % DMSO gelöst. Abschließend wurden die Zellen in Kryoröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aliquotiert und zunächst für einen Tag bei – 80 °C tief gefroren, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

PBS

0,2 M NaCl

2,5 M KCl

8 mM Na₂HPO₄

pH 7,4

2.7 Isolierung von Hepatozyten aus der Maus

Für die Isolierung von primären murinen Hepatozyten wurden 8 – 10 Wochen alte Wildtyp- und gp130Ras Δ hepa-Mäuse mit einem gemischten genetischen Hintergrund verwendet [102]. Gp130Ras Δ hepa-Mäuse exprimieren einen mutierten gp130-

Rezeptor in der Leber, bei dem das Tyrosin 757 (analog zum Tyrosin 759 im Menschen) zu Phenylalanin mutiert ist. Die Isolierung der Hepatozyten aus der Maus wurde von Sibille Sauer-Lehnen und Carmen G. Tag (Medizinische Klinik III – Q3-Plattform, AG Trautwein, UK Aachen) durchgeführt.

Lösungen B und C wurden im Wasserbad bei 37 °C in einem Schlauchsystem zirkulieren gelassen. Die Maus wurde anästhesiert und anschließend ihr Bauchraum eröffnet. Die Vena portae wurde mit einer Venenverweilkanüle kanuliert, welche mit Lösung B befüllt war. Die Spritze der Venenverweilkanüle wurde entfernt und das Schlauchsystem mit Lösung B angeschlossen, was zur Perfusion der Leber führte. Die Flussrate der Perfusion betrug 8 ml/min. Zusätzlich wurde Heparin injiziert und zum Druckausgleich die Vena cava inferior durchschnitten. Nach Blutentleerung der Leber wurde Lösung B durch Lösung C ersetzt, welche Kollagenase (Liberase TM Research Grade; Roche) beinhaltet, die zur Auflösung der Kollagenstrukturen führte. Die Leber wurde entnommen und in eine Petrischale mit kaltem Waschmedium überführt. Nach Entfernen der Gallenblase wurden die Leberkapseln aufgerissen und die Hepatozyten ausgeschüttelt. Die Zellsuspension wurde durch 100 µm Nylongaze filtriert und mit Waschmedium aufgefüllt. Anschließend wurde für vier Minuten bei 16 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in Waschmedium aufgenommen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und ihre Vitalität und Zellzahl bestimmt (Casy; Roche).

Waschmedium

DMEM

1 % Penicillin/Streptomycin

4 mM L-Glutamin

10 % FKS

Lösung B

Lösung A

+ 1 mM EDTA pH 8,0

Lösung C

Lösung A

+ 2 mM CaCl_2

+ 2 mg Liberase TM Research Grade (Roche)

Lösung A

154 mM NaCl_2

5,6 mM KCl

11 mM Glucose

20 mM HEPES

25 mM NaHCO_3

pH 7,4

2.7.1 Nährmedien und Lösungen

William's Medium E ohne Phenolrot

(Sigma Aldrich)

FKS (mykoplasmafreies fötales Kälberserum)

(PAA)

Penicillin/Streptomycin

(Life Technologies)

L-Glutamin

(Life Technologies)

Dexamethason

(Sigma Aldrich)

Rat tail Collagen Type I

(BD Biosciences, Heidelberg,
Deutschland)

2.7.2 Kultivierung

Nach Isolation der Hepatozyten wurden 7×10^5 Zellen auf Kollagen-beschichteten 6 cm Petrischalen ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in William's Medium E, supplementiert mit 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 100 nM Dexamethason in wassergesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO_2 . Nach Absetzen der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und anschließend in William's Medium E mit 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 100 nM Dexamthason über Nacht weiterkultiviert. Drei Stunden vor Versuchsbeginn wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 3 x mit

PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in William's Medium E mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin ohne FKS aufgenommen.

2.8 Herstellung von Zelllysaten

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl (10 cm Petrischale) oder 200 µl (6 cm Petrischale) 4 °C kaltem RIPA-Lyse-Puffer versetzt und in ein Reagiergefäß (Sarstedt) überführt. Die Lyse erfolgte für 30 Minuten auf Eis. Anschließend wurde der Zelldebris für 10 Minuten bei 13 000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die Proteinkonzentration in den Überständen wurde nach Bradford bestimmt (s. 2.11). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Überstände bei – 20 °C tiefgefroren.

RIPA-Lyse-Puffer

50 mM	Tris/HCl pH 7,4
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
0,5 %	Nonidet-P40 (MP Biomedicals)
15 %	Glycerol

Proteaseinhibitoren (frisch zugegeben):

1 mM	Na ₃ VO ₄
1 mM	NaF
5 mg/ml	Pepstatin
10 mg/ml	Aprotinin
5 mg/ml	Leupeptin
100 mM	Pefabloc

2.9 Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Es wurden je 3 µl der Proben mit 997 µl 1x Bradford-Reagenz (BioRAD) versetzt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption gegen eine Referenz, bestehend aus 1 ml Bradford-Reagenz, in einer

1 cm Einmalküvette gemessen. Die Massenkonzentration wurde anhand einer BSA-Eichgeraden ermittelt.

2.10 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wurde mit einem 10 %igen oder 15 %igen Trenngel bei 25 mA in einer vertikalen Flachgelkammer (BioMetra, Göttingen, Deutschland; BioRAD) durchgeführt. Je nach Versuch wurden zwischen 15 µg und 100 µg Protein mit 1 x Lämmli-Puffer versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Anschließend erfolgte die Auftragung auf das Gel. Als Größenreferenz wurde der Marker *Precision Plus* (GE Healthcare) oder *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) verwendet. Nach der Auftrennung der Proteine erfolgte die Übertragung auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot (s. 2.11).

Tab.1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

	<i>Trenngel</i>		<i>Sammelgel</i>
	10 %	15 %	4%
Aqua dest.	5,9 ml	3,5 ml	4 ml
Acrylamidlösung (30 %)	4,9 ml	7,2 ml	635 µl
1,5 M Tris/HCl pH 6,8	3,8 ml	3,8 ml	-
2 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	313 µl
20 % SDS	75 µl	75 µl	25 µl
TEMED	15 µl	15 µl	5 µl
APS	75 µl	75 µl	40 µl

Acrylamidlösung 30 % (AppliChem, Deutschland)

29 %	Acrylamid
1 %	Bisacrylamid
1,92 M	Glycin
0,5 %	SDS

4 x Lämmli-Probenpuffer

40 %	Glycerin
20 %	β-Mercaptoethanol
8 %	SDS
250 mM	Tris-HCl pH 6,8
0,4 %	Bromphenolblau

1 x SDS-Runningbuffer

0,25 M	Tris-Base pH 8,3
1,92 M	Glycin
0,5 %	SDS

2.11 Western Blot

Zur Übertragung der durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Pall Corporation, Port Washington, NY, USA), wurde die *Semi-dry* Western-Blot-Methode angewandt. Dazu wurden drei 3 mm Filter-Papiere (GE Healthcare) und die Membran auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten. Von den drei Filter-Papieren wurde je eines in Anodenpuffer I, in Anodenpuffer II und in Kathodenpuffer getränkt. Die Membran wurde für 5 Sekunden mit 100 % Methanol benetzt, für 5 Minuten in Aqua dest. geschwenkt und anschließend für 15 Minuten in Anodenpuffer II getränkt. Der Western-Blot wurde folgendermaßen aufgebaut:

1. Graphitplatte
2. ein Filter-Papier, getränkt in Anodenpuffer I
3. ein Filter-Papier, getränkt in Anodenpuffer II
4. PVDF-Membran
5. SDS-Gel
6. ein Filter-Papier, getränkt in Kathodenpuffer
7. Graphitplatte

Die Übertragung der Proteine von dem Gel auf die Membran erfolgte in 90 Minuten bei einer Stromdichte von 0,8 mA/cm².

Anodenpuffer I

0,3 M	Tris-Base pH 10,4
20 %	Methanol

Anodenpuffer II

0,025 M	Tris-Base pH 10,4
20 %	Methanol

Kathodenpuffer

0,025 M	Tris-Base pH 10,4
0,04 M	ϵ -Aminocapronsäure
20 %	Methanol

2.12 Detektion der Proteine auf der PVDF-Membran

Nach der Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran wurden freie Bindungsstellen mit 10 % BSA in TBS-N-Lösung (Serva, Heidelberg, Deutschland) für 30 Minuten blockiert. Nach anschließendem Waschen mit TBS-N wurde der Erstantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 zugegeben und über Nacht auf der Membran bei 4 °C belassen. Dann wurde 3 x mit TBS-N gewaschen und der HRP-konjugierte Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:5000 für 30 Minuten zugegeben. Abschließend wurde 3 x mit TBS-N gewaschen. Der Nachweis der Proteine erfolgte über *enhanced chemiluminescence* (Millipore Corporation) mit einem LAS-3000 (Fujifilm Life Science, Düsseldorf, Deutschland). Die densitometrischen Analysen wurden mit der *Multi Gauge* Software (Fujifilm Life Science) durchgeführt. Für eine erneute Detektion von Proteinen auf der Membran wurden die Antikörper von der Membran entfernt. Dazu wurde *Stripping-Buffer* zugegeben und die Membran für 20 Minuten bei 70 °C inkubiert.

TBS-N

20 mM	Tris/HCl pH 7,6
140 mM	NaCl
0,1 %	NP-40

Stripping-Buffer

62,5 M	Tris/HCl pH 6,7
2 %	SDS
100 mM	β- Mercaptoethanol (frisch zugegeben)

2.13 Rap1-pulldown assay

3 x 10⁶ Zellen wurden auf 10 cm Petrischalen ausgesät und über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Nach Stimulation wurden Zelllysate hergestellt (s. 2.8). Als Lysepuffer wurde *pulldown*-Lysepuffer verwendet. Zur Messung von aktivem, GTP-gebundenem Rap1 in den Zellen wurden 10 µl Glutathion-*magnetic beads* (Bioclone, San Diego, CA, USA) mit je 20 µg GST-RalGDS RBD (s. 2.4) für vier Stunden bei 4 °C über-Kopf-schüttelnd inkubiert. Die beads wurden anschließend 3 x mit *pulldown*-Lysepuffer gewaschen und mit 800 µg Protein pro Probe für 1,5 Stunden bei 4 °C über-Kopf-schüttelnd inkubiert. Die beads wurden 3 x mit *pulldown*-Lysepuffer gewaschen und anschließend in 10 µl 1 x Lämmli-Probenpuffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden über SDS-Gelelektrophorese (s. 2.10) und Western Blotting (s. 2.11) weiterbearbeitet. Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz mit einem spezifischen Antikörper gegen Rap1 (s. 2.12).

pulldown-Lysepuffer

50 mM	Tris/HCl pH 7,5
200 mM	NaCl ₂
2 mM	MgCl ₂
10 %	Glycerol
1 %	Igepal

Proteaseinhibitoren (frisch zugegeben):

1 mM	Na ₃ VO ₄
1 mM	NaF
5 mg/ml	Pepstatin
10 mg/ml	Aprotinin

5 mg/ml Leupeptin
100 mM Pefabloc

2.14 Zellfraktionierung

3×10^6 Zellen wurden auf 10 cm Petrischalen ausgesät und über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Nach Stimulation wurden die Zellen in PBS abgeschabt, in ein Reagiergefäß überführt und für 5 Minuten bei 500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 100 µl hypotonischem Lysepuffer für 15 Minuten auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 2000 rpm und 4 °C wurde der Überstand abgenommen, welcher die zytoplasmatische Fraktion enthielt, und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Das Pellet, welches die Nuklei enthielt, wurde in 500 µl *nuclear isolation buffer* resuspendiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 5 Minuten bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Schritt wiederholt. Die isolierten Nuklei wurden in 50 µl *nuclear lysis buffer* aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4° C wurde der Überstand abgenommen, welcher die Kernextrakte enthielt, und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Hypotonischer Lysepuffer

10 mM Tris/HCl pH 7.5
10 mM NaCl
3 mM MgCl₂

nuclear isolation buffer

10 mM Tris/HCl pH 7.5
10 mM NaCl
3 mM MgCl₂
0.5 % NP-40

nuclear lysis buffer

20 mM Tris/HCl pH 7.5

280 mM NaCl

2 % Triton X-100

Proteaseinhibitoren (jeweils frisch zugegeben):

1 mM Na_3VO_4

1 mM NaF

5 mg/ml Pepstatin

10 mg/ml Aprotinin

5 mg/ml Leupeptin

100 mM Pefabloc

2.15 Reporter-gen-Analyse

Zum Nachweis genregulatorischer Eigenschaften von Proteinen wurden Reporter-gen-Analysen durchgeführt. Hierbei wird ein Vektorkonstrukt, bestehend aus einem Promotor und einem Reporter-gen sowie ein Kontrollvektorkonstrukt als interner Standard, in die Zellen transfiziert und anschließend deren Aktivität gemessen. Als Reporter-gen kann z. B. die Leucht-käfer-Luziferase verwendet werden. Die Stärke der Expression ist ein Maß für die Aktivität des davor liegenden Promotors und lässt daher Rückschlüsse auf die genregulatorischen Eigenschaften des zu untersuchenden Proteins zu. Der interne Standard dient dem Zweck, Schwankungen der Messwerte, welche beispielsweise durch die Anzahl der Zellen oder der Transfektionseffizienz entstehen, zu korrigieren. Ein Beispiel für einen solchen Standard ist ein Vektorkonstrukt, welches die konstitutive Expression der β -Galaktosidase bewirkt.

2.15.1 Transfektion der Zellen

3×10^5 Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion auf eine 6 well-Platte à 3,5 cm/ well ausgesät. Die transiente Transfektion erfolgte liposomal mit dem Transfektionsreagenz *Lipofectamin 2000* (Life Technologies). Dazu wurden pro Platte 0,3 μg des Promotor-Reporterkonstruktes und 1 μg des β -Galaktosidase-

Kontrollreporterkonstrukts in 37 °C warmem OptiMEM (Life Technologies) vorgelegt. *Lipofectamin* wurde im Verhältnis 1:2 (Menge DNA:Volumen *Lipofectamin*) zugegeben. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze auf die Zellen verteilt. Fünf Stunden später erfolgte ein Mediumwechsel auf FKS-freies Kulturmedium.

2.15.2 Herstellung von Zelllysaten

Es wurden Zelllysate hergestellt (s. 2.8). Als Lysepuffer wurde Extraktionspuffer verwendet. Die Überstände wurden für die Bestimmung der Luziferase- und β -Galaktosidase-Aktivität verwendet.

Extraktionspuffer

5 mM	Tris/H ₃ PO ₄ pH 7,8
0,4 mM	EDTA
2 %	Glycerin
0,2 %	Triton X-100
0,1 %	DTT

2.15.3 Bestimmung der Luziferase-Aktivität

Die Luziferase-Aktivität in den Proben wurde mithilfe des *Luziferase Kits* (Promega) nach Herstellerangaben bestimmt. Dazu wurden je 10 μ l der Zelllysate vorgelegt und kurz vor der Messung mit 50 μ l Luziferase-Substrat versetzt. Die Messung erfolgte mit dem Luminometer Microlumat 96 P (EG&G Berthold, Wildbad, Deutschland).

2.15.4 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Es wurden je 100 μ l der Lysate mit 500 μ l β -Galaktosidase-Puffer und 100 μ l ONPG versetzt. Als Referenz diente ein Ansatz ohne Lysatzugabe. Das Reaktionsgemisch wurde solange bei 37 °C inkubiert, bis eine Gelbfärbung sichtbar war. Daraufhin wurde die Reaktion mit 250 μ l Na₂CO₃ gestoppt und die Aktivität der β -Galaktosidase im Photometer bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmt.

β-Galaktosidase-Puffer

60 mM	Na ₂ HPO ₄
40 mM	NaH ₂ PO ₄
1 mM	KCl
1 mM	MgCl ₂
3,86 ml/l	β-Mercaptoethanol

2.16 *in vivo*-Versuche an der Maus

Für die in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Versuche wurden 8 – 10 Wochen alte Wildtyp- und gp130Ras Δ hepa-Mäuse mit einem gemischten genetischen Hintergrund verwendet [102]. Die Injektion der entsprechenden Stimulanzen erfolgte intraperitoneal. Nach Stimulation wurde retro-orbitales Blut entnommen und die Maus anschließend durch Luxation der Halswirbelsäule getötet. Der Bauchraum wurde eröffnet und die Leber entnommen.

2.16.1 Gewinnung von Blutserum

Das retro-orbitale Blut wurde in Reagiergefäße zur Serumgewinnung (Sarstedt) gesammelt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um das Serum von den zellulären Bestandteilen des Blutes zu trennen, wurde für 5 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.16.2 Gewinnung von RNA aus Lebergewebe

Die entnommene Leber wurde von der Gallenblase getrennt und jeder Leberlappen in gleich viele Teile geschnitten. Eine Probe jedes Leberlappens wurde in ein Kryoröhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zur Gewinnung von Gesamt-RNA wurde das noch gefrorene Gewebe in einem Mörser zerkleinert und in ein Reagiergefäß überführt. Anschließend wurde mit 1 ml Trizol (Life Technologies) das Gewebe weiterbehandelt, bis die Suspension Fäden zog. Es wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und die Proben für 2 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor sie für 15 Minuten bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurden. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reagiergefäß

überführt und die RNA mit 70 % Ethanol im Verhältnis 1:1 gefällt. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte mit dem *Rneasy Mini Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.17 ELISA

Mit einem *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) können über spezifische Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen Proteine und niedermolekulare Stoffe in einer Probe nachgewiesen werden. Zur Konzentrationsbestimmung des Akutphase-Proteins SAA im Blut, wurde das in 2.16.1 gewonnene Serum aus der Maus 1:200 verdünnt und ein SAA-ELISA nach Herstellerangaben durchgeführt (Dunn Labortechnik, Asbach, Deutschland).

2.18 Real-Time-quantitative-PCR

Bei der *Real-Time*-quantitativen-PCR (RT-qPCR) ist es möglich mithilfe fluoreszenzmarkierter Farbstoffe oder Sonden die Amplifikation von cDNA über die Zeit zu verfolgen. Das Fluoreszenzsignal ist dabei proportional zur gebildeten Menge an DNA und dient somit deren Quantifizierung.

2.18.1 RNA-Isolation

Die Isolation von RNA erfolgte mit dem *Rneasy Mini Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die anschließende Bestimmung der RNA-Konzentration in den Proben fand photometrisch am Nanodrop (Thermo Scientific) über die OD₂₆₀ statt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei – 20 °C gelagert.

2.18.2 cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA wurde das *Omniscript-RT-PCR-Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Dazu wurden im ersten Schritt 500 ng RNA in 10 µl RNase-freiem Wasser vorgelegt und für 10 Minuten bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurde jedem Ansatz 10 µl *Master-Mix* zugegeben. Die cDNA Synthese erfolgte in 1 Stunde bei 37 °C. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Master-Mix

1 x Buffer RT
 2 mM dNTPs
 1 µM *random primer*
 4 U reverse Transkriptase
 ad 10 µl RNase-freies H₂O

2.18.3 TaqMan® PCR

Die cDNA wurde mit Sonden für die entsprechenden Zielgene sowie das Referenzgen amplifiziert (Life Technologies).

Tab.2: *Taqman*-Sonden und ihre Bestellnummer

Taqman gene expression assay	Katalognummer
HPRT (human)	Hs99999909_m1
HPRT (murin)	Mm01545399_m1
FGG (human)	Hs00241037_m1
FGG (murin)	Mm00513575_m1
SAA (murin)	Mm00656927_g1
SOCS3 (human)	Hs00269575_s1
Tfpi2 (murin)	Mm00436948_m1

Der Master-Mix für die PCR setzte sich wie folgt zusammen:

10 µl qPCR MasterMix Plus (Eurogentec, Köln, Deutschland)
 1 µl Sonden/ Primer-Mix
 2 µl cDNA
 ad 20 µl Rnase-freies H₂O

Der Mastermix wurde mit einem Pipettierroboter (Qiagen) hergestellt. Zum Ausgleich intraexperimenteller technischer Schwankungen wurde jede Probe im Duplikat gemessen. Die Messung erfolgte mit einem Rotorgene (Qiagen).

PCR Programm

50 °C	2'	UDG-Inkubation	
95 °C	10'	Enzymaktivierung	
95 °C	15''	Denaturierung	} 40 Zyklen
60 °C	1'	Anlagerung der Primer	

Die Zyklenzahl (CT), bei der das Fluoreszenzsignal der Probe die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, wurde bestimmt. Die CT-Werte der Proben wurden dabei mit den CT-Werten des Referenzgens normalisiert. Die Auswertung erfolgte nach der Methode von Pfaffl [103].

2.19 Konfokale Mikroskopie

Es wurde ein konfokales Laser-Scanning Mikroskop des Typs Zeiss LSM 510 (Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet. Dieses Mikroskop verfügt über einen Argon-Ionen-Laser und einen Helium-Neon-Laser. Die YFP-Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 514 nm, die CFP-Anregung bei 458 nm mit dem Argon-Laser. Für die Bildaufnahmen wurde ein 63-fach vergrößerndes, wasserkorrigiertes Objektiv mit einer numerischen Apertur von 1,2 vom Typ Zeiss C-Apochromat 63/1.2w Korr (Zeiss) verwendet. Der Durchmesser der konfokalen Blende war auf eine *Airy Unit* eingestellt, was bei einer Anregungswellenlänge von 514 nm eine Ebenenschichtdicke der konfokalen Aufnahmen von ca. 1 µM ergab.

2.19.1 Fixierung von Zellen ohne Antikörper

1×10^5 -Zellen wurden auf Poly-L-Lysin-gecoateten *coverslips* (Ø 18 mm; Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, Deutschland) in einer 12-well Platte à 3,8 cm²/well ausgesät. Die transiente Transfektion des entsprechenden Vektorkonstrukts erfolgte liposomal mit dem Transfektionsreagenz *Lipofectamin 2000* (Life Technologies). Dazu wurden pro Platte 1 µg Vektorkonstrukt in 37 °C warmem OptiMEM vorgelegt. *Lipofectamin* wurde im Verhältnis 1:2 (Menge DNA:Volumen *Lipofectamin*) zugegeben. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze auf die Zellen verteilt. Fünf Stunden später erfolgte ein Mediumwechsel auf Kulturmedium. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht in

FKS-freiem Medium kultiviert. Nach erfolgter Stimulation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 2 x mit PBS⁺⁺ gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 3,1 % Paraformaldehyd für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Zellen wurden mit PBS⁺⁺ gewaschen und zur Reduktion der Eigenfluoreszenz mit NH₄Cl für 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln behandelt. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS⁺⁺ gewaschen. Die *coverslips* wurden in H₂O gedippt und anschließend auf Objektträger (76 x 26 mm; R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) überführt. Als Einbettmedium wurde *ImmuMount* (Thermo Scientific) verwendet. Die *coverslips* wurden mit farblosem Nagellack versiegelt und bis zur weiteren Verwendung dunkel bei Raumtemperatur gelagert.

2.19.2 Fixierung von Zellen mit Antikörpern

1 x 10⁵-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin-gecoateten *coverslips* ausgesät und über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Nach erfolgter Stimulation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 2x mit PBS⁺⁺ gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit Methanol für 15 Minuten bei -20 °C im Dunkeln. Die Zellen wurden mit PBS⁺⁺ gewaschen und für 5 Minuten im Dunkeln mit PBS^{T++} permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit NH₄Cl für 5 Minuten im Dunkeln behandelt. Es wurde mit PBS^{T++} gewaschen und dann für 1 Stunde mit 1 % BSA-haltigem PBS^{T++} bei Raumtemperatur im Dunkeln blockiert. Die *coverslips* wurden über Nacht bei 4 °C mit Erstantikörper (1:200) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,2 % BSA-haltigem PBS^{T++} wurde der Zweitantikörper (1:200) hinzugegeben und für 45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln auf den Zellen belassen. Anschließend wurde 3x mit 0,2 % BSA-haltigem PBS^{T++} gewaschen. Die *coverslips* wurden in H₂O gedippt und anschließend auf einen Objektträger überführt. Als Einbettmedium wurde *ImmuMount* verwendet. Die *coverslips* wurden mit farblosem Nagellack versiegelt und bis zur weiteren Verwendung dunkel bei Raumtemperatur gelagert.

PBS⁺⁺

1 mM MgCl₂

0,1 mM CaCl₂

in PBS

PBS^{T++}

0,1 % Triton X-100 in PBS^{T++}

2.20 Microarray

Zur Identifikation ERK1/2-abhängiger Gene nach IL-6-Stimulation wurde eine *microarray*-Analyse in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Bernd Denecke (*Chip Facility*, IZKF BIOMAT, RWTH Aachen University) durchgeführt.

3 x 10⁶ primäre murine Hepatozyten wurden auf 10 cm Kollagen-beschichteten Petrischalen ausgesät und wie unter 2.8.2 beschrieben kultiviert. Nach Stimulation der Zellen mit IL-6 und dem MEK-Inhibitor U0126 für vier Stunden wurde die RNA mithilfe des *Rneasy Mini Kits* (Qiagen, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert. Die Qualität der RNA wurde mit dem *RNA 6000 Nano Assay* (Agilent 2100 Bioanalyzer; Agilent) und die Quantität mit dem *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific) bestimmt. Die weitere Behandlung der RNA erfolgte anhand des *GeneChip® Whole Transcript (WT) Sense Target labelling Assays* nach Herstellerangaben (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Die Biotin-markierten Proben wurden bei 45°C für 16 Stunden auf dem Array hybridisiert (Affymetrix *GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array*) und anschließend nach Herstellerangaben gewaschen und angefärbt (*GeneChip® Fluidic Station 450*; Affymetrix). Die angefärbten Proben wurden mit dem *GeneChip® Scanner 3000 7G* (Affymetrix) gescannt und mit der *GeneChip Command Console Software* (Affymetrix) ausgewertet. Die gewonnenen Daten wurden mithilfe eines *Robust Multi-array Average* (RMA)-Algorithmus aufgearbeitet [104]. Es wurden nur Gene, die unter mindestens einer Versuchsbedingung eine 3-fach stärkere Expression zeigten als die Negativkontrolle, in die weitere Analyse miteinbezogen. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte in excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

3 Ergebnisse

3.1 *Cross-talk* zwischen Glucocorticoiden und IL-6

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion untersucht. Dieses Projekt wurde gleichberechtigt in Zusammenarbeit mit Dipl.-Biol. Anna Dittrich, mittlerweile tätig am Institut für Biologie, Abteilung Systembiologie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg bearbeitet. Die Arbeit wurde bereits mit Dittrich und Khouri als gleichberechtigte Erst-Autoren publiziert [105].

3.1.1 Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Genexpression

Nach IL-6-Stimulation kommt es zur Expression IL-6-abhängiger Zielgene. Zur Analyse, ob Glucocorticoide die IL-6-induzierte Genexpression modulieren können, wurden RT-qPCR-Analysen mittels *Taqman*® PCR durchgeführt. Dazu wurden sowohl primäre murine Hepatozyten als auch humane HepG2-Zellen mit IL-6 und Dexamethason (Dex) für vier Stunden stimuliert.

Abb. 9 zeigt, dass IL-6 sowohl in den primären murinen Hepatozyten (Abb. 9A) als auch in den humanen Leber-Hepatoma-Zellen (Abb. 9B) zu einer deutlichen Expression der γ -Fibrinogen (FGG)-mRNA führt. Bei zusätzlicher Behandlung der Zellen mit Dexamethason kommt es zu einer weiteren Steigerung der Genexpression, während die alleinige vierstündige Anwendung von Dexamethason keinen Einfluss auf die FGG-mRNA Expression hat.

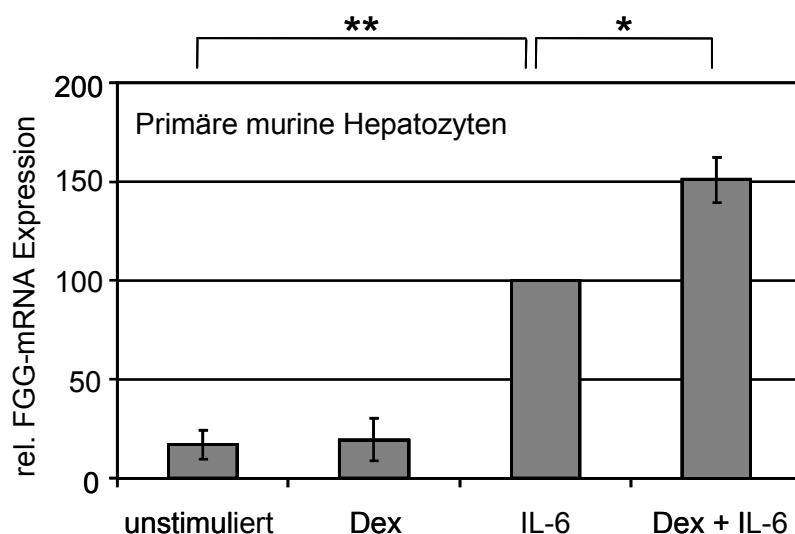
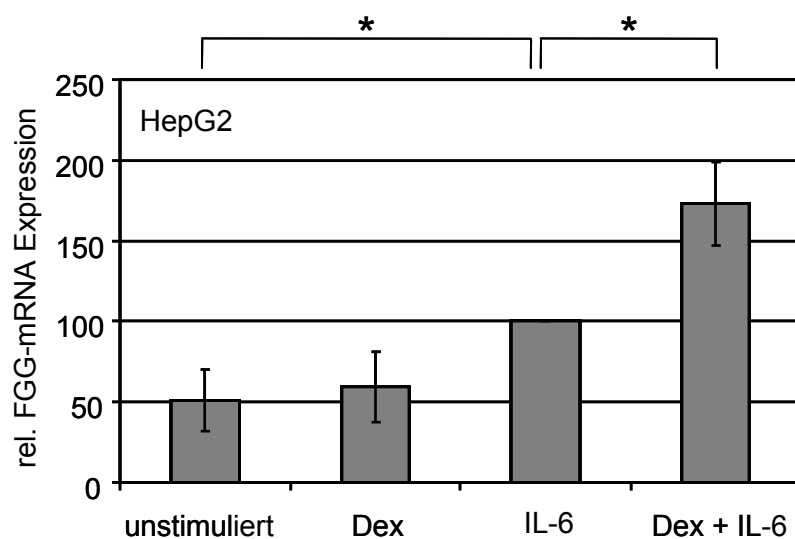
A**B**

Abb. 9: Einfluss von Dexamethason auf die IL-6-induzierte FG-mRNA Expression

Primäre murine Hepatozyten (**A**) und HepG2-Zellen (**B**) wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit murinem bzw. humanem IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ Dexamethason (1 μ M) für vier Stunden. Nach Lyse der Zellen wurde die RNA isoliert und anschließend cDNA synthetisiert, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Expression der mRNA wurde mit spezifischen Sonden für FG und HPRT gemessen (s. Material und Methoden). Die Auswertung erfolgte nach Pfaffl. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die mRNA-Expression nach IL-6-Stimulation wurde auf 100 % gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten student's t-test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

3.1.2 Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die STAT3-Phosphorylierung

IL-6 führt zur Aktivierung des Jak/STAT-Signalwegs und der MAPK-Kaskade (s. 1.5). Zur Analyse, ob FGG ein STAT3-abhängiges Zielgen nach IL-6-Stimulation ist, wurde eine Reporteragen-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden HepG2-Zellen transient mit einem Reporterkonstrukt transfiziert, welches aus der Leuchtkefer-Luziferase unter Kontrolle des humanen FGG-Promotors besteht. Als interner Standard diente ein Kontrollvektorkonstrukt, welches eine konstitutive Expression der β -Galaktosidase bewirkte. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem chimären Wildtyp-Erythropoetin/gp130-Rezeptor (EpoR/gp130 6Y) oder einer Rezeptormutante (EpoR/gp130 FY4F) transfiziert. Durch Transfektion der chimären Rezeptoren ist es möglich, mit Erythropoetin (Epo) nur transfizierte Zellen zu stimulieren, wobei die gleichen Signalwege aktiviert werden, wie nach IL-6-Stimulation. Der endogene IL-6R α /gp130-Rezeptorkomplex wird dabei nicht aktiviert. Bei der verwendeten Rezeptormutante ist die IL-6-induzierte Aktivierung des Jak/STAT-Signalwegs unterbunden, aber nicht die Aktivierung der MAPK-Kaskade (für eine genaue Beschreibung der Rezeptoren s. 2.4).

Abb. 10 zeigt, dass es bei Expression der Wildtyp-Rezeptorchimären zu einer starken Aktivierung des FGG-Promotors nach Epo-Stimulation kommt. Im Gegensatz dazu kommt es bei Expression der mutierten Rezeptorchimären nach Epo-Stimulation zu keiner Aktivierung des FGG-Promotors, was die STAT3-Abhängigkeit des FGG-Promotors zeigt.

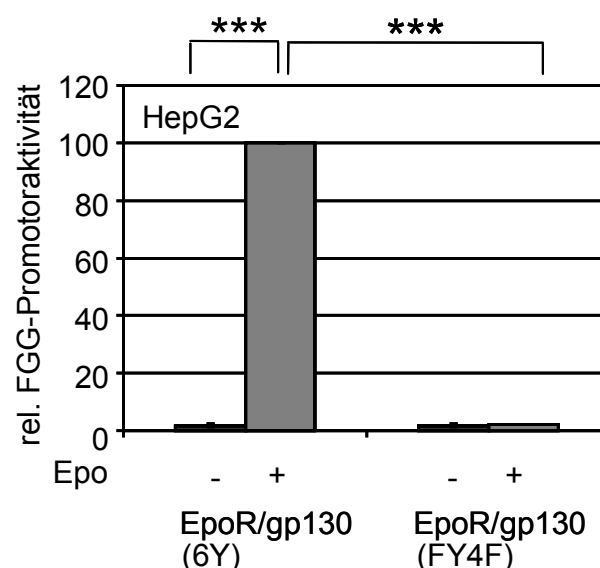
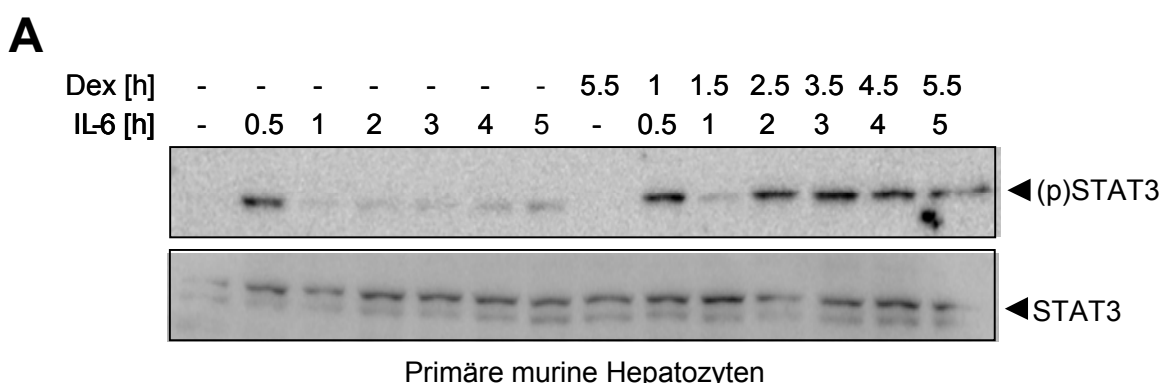


Abb. 10: Reporter-Gen-Analyse zur STAT3-Abhängigkeit des FGG-Promotors

HepG2-Zellen wurden mit dem Wildtyp-Rezeptorkonstrukt EpoR/gp130 6Y oder der Rezeptormutante EpoR/gp130 FY4F sowie einem Reporterkonstrukt für den FGG-Promotor und einem Kontrollvektorkonstrukt für eine konstitutive Expression der β -Galaktosidase transient transfiziert. Die Zellen wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Die Stimulation der Zellen erfolgte für vier Stunden mit Epo (7 U/ml). Nach Lyse der Zellen erfolgte die Bestimmung der Promotoraktivität wie in Material und Methoden beschrieben. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die Aktivität des Promotors nach Epo-Stimulation bei Expression des WT-Rezeptors wurde auf 100 % gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten student's t-test: *** $p \leq 0,001$.

Da die Aktivierung des FGG-Promotors stark STAT3-abhängig ist, wurde untersucht, ob Dexamethason die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung modulieren kann. Sowohl primäre murine Hepatozyten als auch HepG2-Zellen wurden bis zu 5 Stunden mit IL-6 stimuliert und dabei jeweils mit Dexamethason 30 Minuten vorbehandelt. Der Einfluss von Dexamethason auf die STAT3-Phosphorylierung wurde im Western Blot untersucht.

Abb. 11 zeigt, dass die Stimulation mit IL-6 sowohl in den primären murinen Hepatozyten (Abb. 11A) als auch in den HepG2-Zellen (Abb. 11B) zu einer transienten STAT3-Phosphorylierung führt, die ihr Maximum nach 30 Minuten erreicht und dann wieder stark abfällt. Bei zusätzlicher Behandlung mit Dexamethason ist die Phosphorylierung von STAT3 im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit IL-6 zu den späten Zeitpunkten verstärkt.



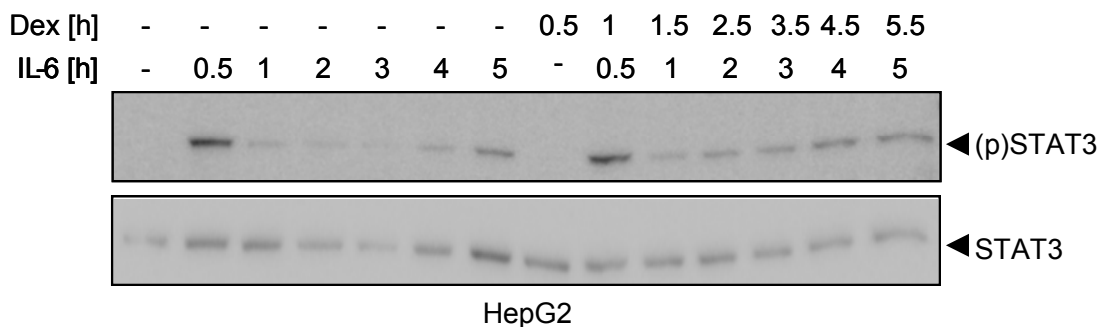
B

Abb. 11: Einfluss von Dexamethason auf die STAT3-Phosphorylierung

Primäre murine Hepatozyten (A) und HepG2-Zellen (B) wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit murinem bzw. humanem IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ Dexamethason (1 μ M) für die angegebenen Zeiten. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern gegen (p)Y STAT3 analysiert. Als Ladungskontrolle diente die Färbung des STAT3-Gesamtproteins. Abgebildet ist je ein repräsentatives Beispiel aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

3.1.3 Glucocorticoide reduzieren die IL-6-induzierte SOCS3-Proteinexpression

SOCS3 ist ein negativer *feedback*-Inhibitor der IL-6-Signaltransduktion, der zu einer verminderten Jak/STAT-Aktivierung in der Zelle führt (s. 1.6.1). Zur Analyse, ob Glucocorticoide die IL-6-induzierte SOCS3-Proteinexpression beeinflussen können, wurden primäre murine Hepatozyten für 30 Minuten mit Dexamethason vorbehandelt und anschließend für 60 Minuten mit IL-6 stimuliert. Die SOCS3 Proteinexpression wurde im Western Blot untersucht.

Abb. 12 zeigt, dass die einstündige Stimulation mit IL-6 zur Expression von SOCS3 führt. In Kombination mit IL-6 vermindert Dexamethason die Menge an gebildetem SOCS3. Die gleiche Beobachtung wurde in HepG2-Zellen gemacht (Diplomarbeit Anna Dittrich).

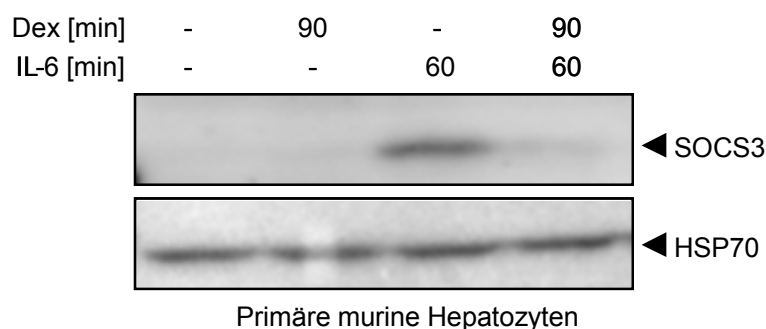


Abb. 12: Einfluss von Dexamethason auf die SOCS3-Proteinexpression

Primäre murine Hepatozyten wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit murinem IL-6 (20 ng/ml) ± Dexamethason (1 µM) für die angegebenen Zeiten. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen SOCS3 analysiert. Als Ladungskontrolle diente die Färbung des HSP70-Gesamtproteins. Abgebildet ist ein repräsentatives Beispiel aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

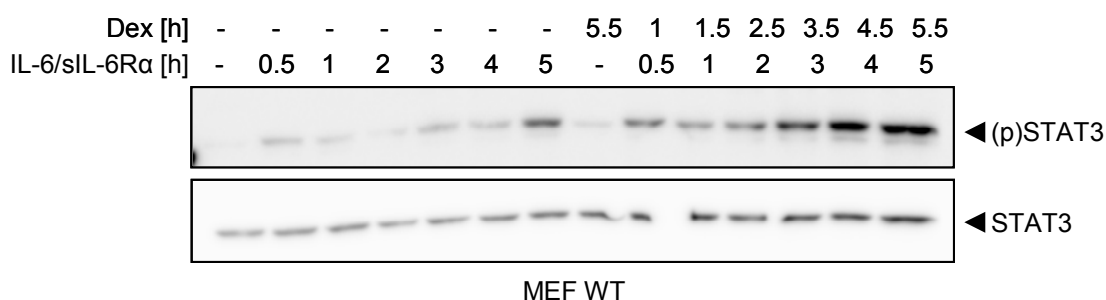
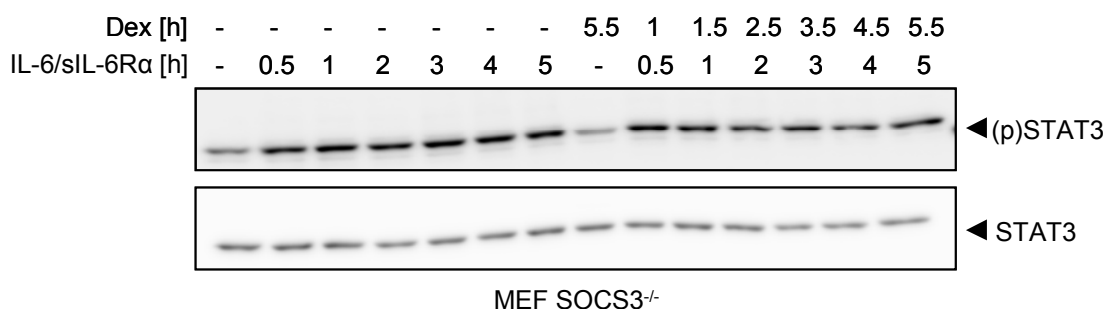
Die Reduktion der Expression des negativen *feedback*-Inhibitors SOCS3 durch Dexamethason könnte der Grund für die beobachtete verlängerte IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung und der verstärkten IL-6-induzierten FGG mRNA-Expression sein. Die Kausalität dieser Beobachtungen wurde in den folgenden Experimenten weiter untersucht.

3.1.4 Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die STAT3-Phosphorylierung in der Abwesenheit von SOCS3

Um den Zusammenhang zwischen der Glucocorticoid-vermittelten reduzierten SOCS3-Expression und der verstärkten IL-6-induzierten STAT3-Phosphorylierung genauer zu untersuchen, wurde der Einfluss von Dexamethason auf die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung in MEF-Zellen mit einem SOCS3 *Knock out* (SOCS3^{-/-}) analysiert. Wie in Leberzellen, führt Dexamethason in MEF Wildtyp (WT)-Zellen zu einer Reduktion der IL-6-induzierten SOCS3-Expression. Dies konnte bereits von Anna Dittrich in ihrer Diplomarbeit gezeigt werden. MEF-Zellen sind daher ein mit Leberzellen vergleichbares Zellsystem, um den Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Signalisierung zu untersuchen.

MEF WT- und MEF SOCS3^{-/-}-Zellen wurden bis zu fünf Stunden mit IL-6 und dem löslichen IL-6-Rezeptor α stimuliert, da MEF-Zellen diesen Rezeptor nicht auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die Zellen wurden jeweils für 30 Minuten mit Dexamethason vorbehandelt. Die STAT3-Phosphorylierung wurde im Western Blot untersucht. Abb. 13A zeigt, dass IL-6 zu einer transienten Phosphorylierung von STAT3 in MEF WT-Zellen führt. Die Behandlung mit Dexamethason führt zu einer verstärkten STAT3-Phosphorylierung zu den späten Zeitpunkten, wie es auch für Hepatozyten gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 11). Im Gegensatz dazu hat Dexamethason keinen Einfluss auf die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung in MEF SOCS3^{-/-}-Zellen (Abb. 13B). Es fällt auf, dass die STAT3-Phosphorylierung nach IL-6-Stimulation in

den SOCS3^{-/-}-Zellen aufgrund des fehlenden negativen SOCS3-*feedbacks* stärker ausgeprägt ist als in den MEF WT-Zellen. Um zu zeigen, dass die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung in den SOCS3^{-/-}-Zellen nicht bereits maximal ist, wurde mit höheren Dosen von IL-6 stimuliert. Zusätzlich wurde mit Onkostatin M (OSM), einem weiteren Cytokin der IL-6-Typ-Cytokine (s. 1.3), stimuliert, welches ein noch stärkerer Induktor des Jak/STAT-Signalwegs als IL-6 ist. Abb. 13C zeigt, dass bei 20 ng/ml IL-6 noch keine Sättigung der STAT3-Phosphorylierung in MEF SOCS3^{-/-}-Zellen eingetreten ist, da diese mit höheren Dosen von IL-6 und mit OSM noch weiter gesteigert werden kann.

A**B**

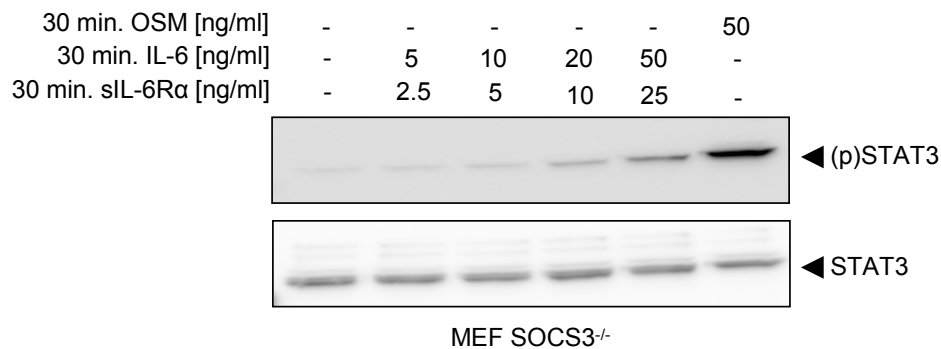
C

Abb. 13: Einfluss von Dexamethason auf die STAT3-Phosphorylierung in SOCS3^{-/-}-Zellen

MEF WT- (A) und MEF SOCS3^{-/-}-Zellen (B) wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit IL-6 (20 ng/ml) + sIL-6Rα (10 ng/ml) ± Dexamethason (1 μM) für die angegebenen Zeiten. (C) MEF SOCS3^{-/-}-Zellen wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit IL-6 + sIL-6R oder mit OSM in den angegebenen Dosen für 30 Minuten. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern gegen (p)Y STAT3 analysiert. Als Ladungskontrolle diente die Färbung des STAT3-Gesamtproteins. Abgebildet ist je ein repräsentatives Beispiel aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

3.1.5 Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion bei Mutation des SOCS3-Rekrutierungsmotivs von gp130

Zur weiteren Untersuchung, ob der Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion SOCS3-abhängig ist, wurde analysiert, ob die SOCS3-Bindestelle am gp130-Rezeptor eine Rolle spielt. Es wurden primäre murine Hepatozyten aus Mäusen isoliert, die in der Leber einen gp130-Rezeptor exprimieren, dessen Tyrosin 757 (analog zum humanen Tyrosin 759) zu Phenylalanin mutiert ist und daher nach Stimulation nicht mehr phosphoryliert werden kann. Dadurch wird die Bindung von SOCS3 an den gp130-Rezeptor verhindert und die Zellen sind resistent gegen das negative SOCS3-feedback. Zunächst wurde analysiert, ob Dexamethason auch in den gp130Y757F-Hepatozyten zu einer verringerten IL-6-induzierten SOCS3-Proteinexpression führt. Dazu wurden die Zellen für eine Stunde mit IL-6 stimuliert und für 30 Minuten mit Dexamethason vorbehandelt. Die SOCS3-Proteinexpression wurde im Western Blot untersucht.

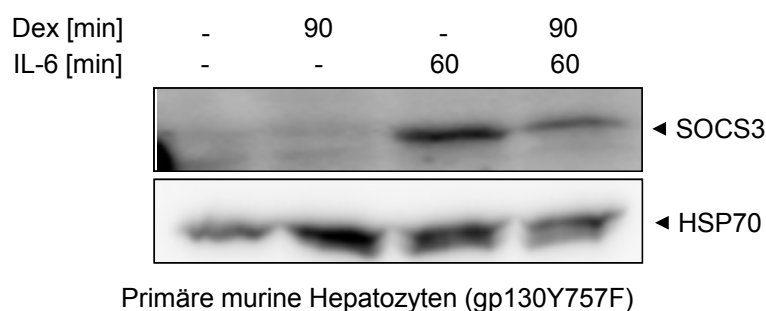
Abb. 14A zeigt, dass Dexamethason die IL-6-induzierte SOCS3-Proteinexpression in den gp130Y757F-Hepatozyten verringert. Die Zellen sind damit bezüglich der

Regulation der SOCS3-Expression durch Dexamethason ein mit den WT-Hepatozyten vergleichbares Zellsystem. Zur Analyse, ob Dexamethason die STAT3-Phosphorylierung in den gp130Y757F-Hepatozyten modulieren kann, wurden die Zellen bis zu fünf Stunden mit IL-6 stimuliert und jeweils für 30 Minuten mit Dexamethason vorbehandelt. Die STAT3-Phosphorylierung wurde im Western Blot untersucht.

Wie Abb. 14B zeigt, führt die Stimulation mit IL-6 zur Phosphorylierung von STAT3 in den gp130Y757F-Hepatozyten, die über den gesamten Zeitraum relativ konstant bleibt. Die zusätzliche Behandlung mit Dexamethason führt zu keiner weiteren Steigerung der STAT3-Phosphorylierung. Um den Einfluss von Dexamethason auf die FGG-mRNA Expression in den gp130Y757F-Hepatozyten zu untersuchen, wurden RT-qPCR-Analysen mittels *Taqman*® PCR durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für vier Stunden mit IL-6 und Dexamethason stimuliert.

Abb. 14C zeigt, dass IL-6 zur Expression der FGG-mRNA in den gp130Y757F-Hepatozyten führt. Bei zusätzlicher Behandlung der Zellen mit Dexamethason kommt es zu keiner weiteren Steigerung der Genexpression. Die alleinige Anwendung von Dexamethason hat keinen Einfluss auf die FGG-mRNA Expression.

A



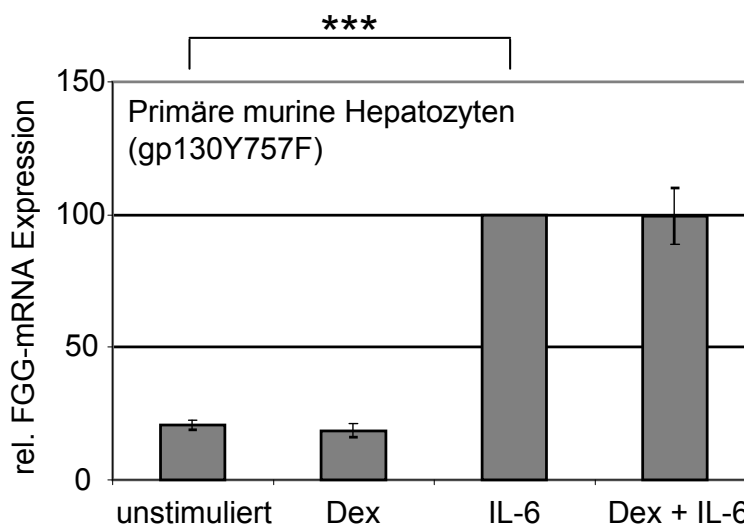
B**C**

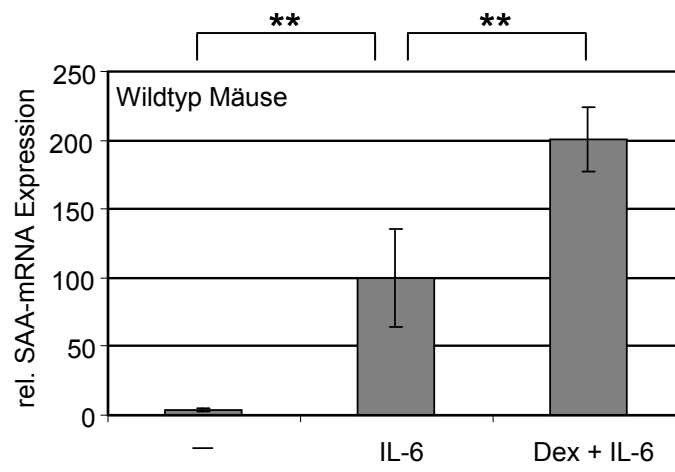
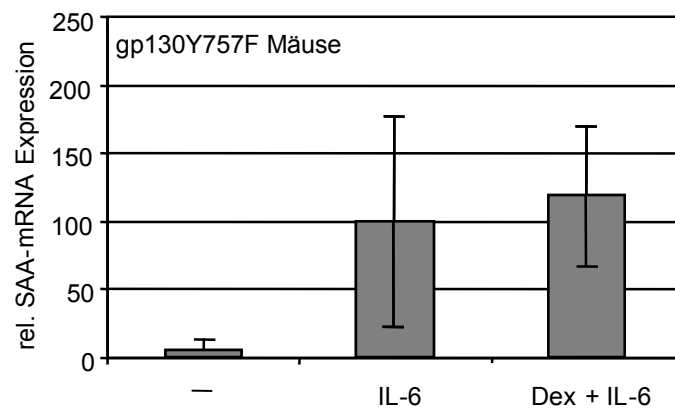
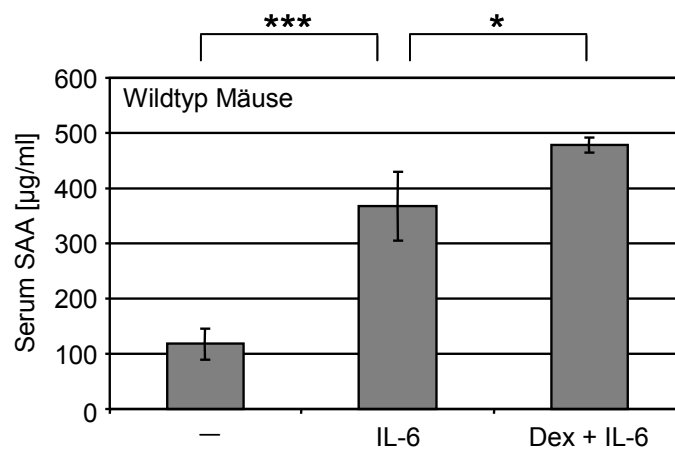
Abb. 14: Einfluss von Dexamethason auf die IL-6-Signalisierung in gp130Y757F-Hepatozyten

Primäre murine Hepatozyten aus Mäusen, die in der Leber eine gp130Y757F-Rezeptormutante exprimieren, wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. **(A), (B)** Die Zellen wurden mit IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ Dexamethason (1 μ M) für die angegebenen Zeiten stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern gegen SOCS3 und (p)Y STAT3 analysiert. Als Ladungskontrolle diente die Färbung des HSP70- und STAT3-Gesamtproteins. Abgebildet ist je ein repräsentatives Beispiel aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. **(C)** Die Zellen wurden mit IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ Dexamethason (1 μ M) für vier Stunden stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die RNA isoliert und anschließend cDNA synthetisiert, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Expression der mRNA wurde mit spezifischen Sonden für FG und HPRT gemessen (s. Material und Methoden). Die Auswertung erfolgte nach Pfaffl. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die mRNA-Expression nach IL-6-Stimulation wurde auf 100 % gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten student's t-test: *** $p \leq 0,001$.

3.1.6 Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Genexpression *in vivo*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Dexamethason die IL-6-induzierte Genexpression in isolierten primären murinen Hepatozyten aus WT Mäusen steigern kann. Dieser Effekt konnte in gp130Y757F-Hepatozyten nicht beobachtet werden. Zur Analyse, ob die in isolierten Zellen beobachteten Effekte auch *in vivo* nachweisbar sind, wurde WT-Mäusen und Mäusen, die in der Leber eine gp130Y757F-Rezeptormutante exprimieren, intraperitoneal IL-6 und Dexamethason injiziert. Nach vier Stunden wurden die Leber und das Blut entnommen. Untersucht wurde die Expression des STAT3-abhängigen IL-6-Zielgens *Serum amyloid A* (SAA) [106], da die basale Expression von FGG, vor allem in den männlichen Mäusen, bereits sehr hoch war. Die mRNA-Expression von SAA im Lebergewebe wurde in RT-qPCR-Analysen mittels *Taqman*® PCR überprüft. Die Konzentration von SAA im Blutserum wurde mittels ELISA bestimmt.

Abb. 15A zeigt die Expression der SAA-mRNA im Lebergewebe von WT-Mäusen. Die Injektion mit IL-6 führt zu einer deutlichen Expression der SAA-mRNA, welche durch die zusätzliche Gabe von Dexamethason weiter gesteigert werden kann. Abb. 15B zeigt die Expression der SAA-mRNA im Lebergewebe von gp130Y757F-Mäusen. Im Gegensatz zu den WT-Mäusen führt die Injektion mit Dexamethason hier zu keiner weiteren Steigerung der IL-6-induzierten SAA-mRNA Expression. Gleiches gilt für die Proteinkonzentration von SAA im Blutserum. Abb. 15C zeigt, dass Dexamethason die Proteinkonzentration von SAA im Blutserum von WT-Mäusen nach Injektion mit IL-6-Stimulation weiter erhöhen kann. In gp130Y757F-Mäusen hingegen hat Dexamethason keinen Einfluss auf die Proteinkonzentration von SAA im Blutserum nach IL-6-Injektion (Abb. 15D). Die *in vivo*-Experimente stützen damit die in Hepatozyten erhaltenen *in vitro* Daten.

A**B****C**

D

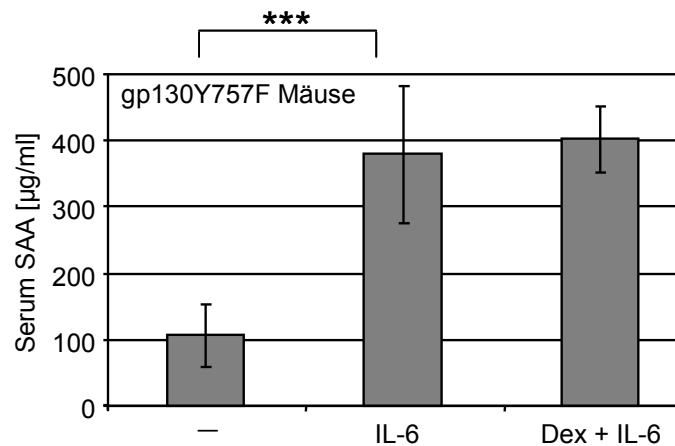


Abb. 15: Einfluss von Dexamethason auf die IL-6-induzierte Genexpression in vivo

WT- und gp130Y757F-Mäusen wurde intraperitoneal IL-6 [2 µg/Maus] und Dexamethason [80 µg/Maus] injiziert. Nach vier Stunden wurde retro-orbitales Blut und die Leber entnommen. (A), (B) Aus dem Lebergewebe wurde RNA isoliert und anschließend cDNA synthetisiert, wie unter Material und Methoden beschrieben. Die Expression der mRNA wurde mit spezifischen Sonden für SAA und HPRT gemessen (s. Material und Methoden). Die Auswertung erfolgte nach Pfaffl. Die Abbildungen zeigen den Mittelwert aus $n = 3-5$ Mäusen pro Versuchsbedingung mit Standardabweichung. Die mRNA-Expression nach IL-6-Stimulation wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten student's t-test: $**p \leq 0,01$. (C), (D) Aus dem retro-orbitalen Blut wurde Serum gewonnen und ein SAA-ELISA durchgeführt, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Abbildungen zeigen den Mittelwert aus $n = 3-5$ Mäusen pro Versuchsbedingung mit Standardabweichung. Angegeben ist der absolute Wert der SAA-Proteinkonzentration im Blutserum. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten student's t-test: $*p \leq 0,05$, $***p \leq 0,001$.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Glucocorticoide die IL-6-induzierte Genexpression verstärken können. Diese Beobachtung konnte kausal mit der Glucocorticoid-vermittelten Inhibition der IL-6-induzierten SOCS3-Proteinexpression in Zusammenhang gebracht werden. Im Folgenden soll der molekulare Mechanismus aufgeklärt werden, wie Glucocorticoide die SOCS3-Proteinexpression regulieren.

3.1.7 Glucocorticoide beeinflussen nicht die Induktion der SOCS3-Expression

Nach IL-6-Stimulation wird SOCS3 STAT3-abhängig exprimiert [48]. Die Expression von SOCS3 unterliegt zu allererst der Aktivierung des IL-6Ra/gp130-Rezeptorkomplexes (s. 1.6). In der Diplomarbeit von Anna Dittrich wurde gezeigt, dass Dexamethason weder die Oberflächenexpression des IL-6-Rezeptors α noch die des gp130-Rezeptors in HepG2-Zellen beeinflusst. Außerdem wurde gezeigt,

dass Dexamethason keinen Einfluss auf die IL-6-induzierte frühe STAT3-Phosphorylierung (15, 30 und 60 Minuten Stimulation mit IL-6) in HepG2-Zellen hat, welche für die Expression von SOCS3 ausschlaggebend ist. Im Zuge der Fortführung der Studien aus der Diplomarbeit von Anna Dittrich wurde in dieser Arbeit die Translokation von STAT3 in den Nukleus untersucht. Dazu wurden HepG2-Zellen mit einem Vektorkonstrukt transient transfiziert, welches für STAT3, fusioniert an CFP, codiert. Die Zellen wurden für bis zu 30 Minuten mit Dexamethason vorbehandelt und anschließend für 30 Minuten mit IL-6 stimuliert. Die Zellen wurden fixiert und die Translokation von STAT3 in den Nukleus mit konfokaler Mikroskopie analysiert.

Abb. 16A zeigt die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie in den fixierten HepG2-Zellen. Im unstimulierten Zustand ist STAT3 gleichmäßig in der Zelle verteilt. Nach IL-6-Stimulation kommt es zur Akkumulation von STAT3 im Nukleus. Dieser Vorgang wird durch Dexamethason nicht beeinflusst. Dexamethason alleine hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Verteilung von STAT3 in der Zelle.

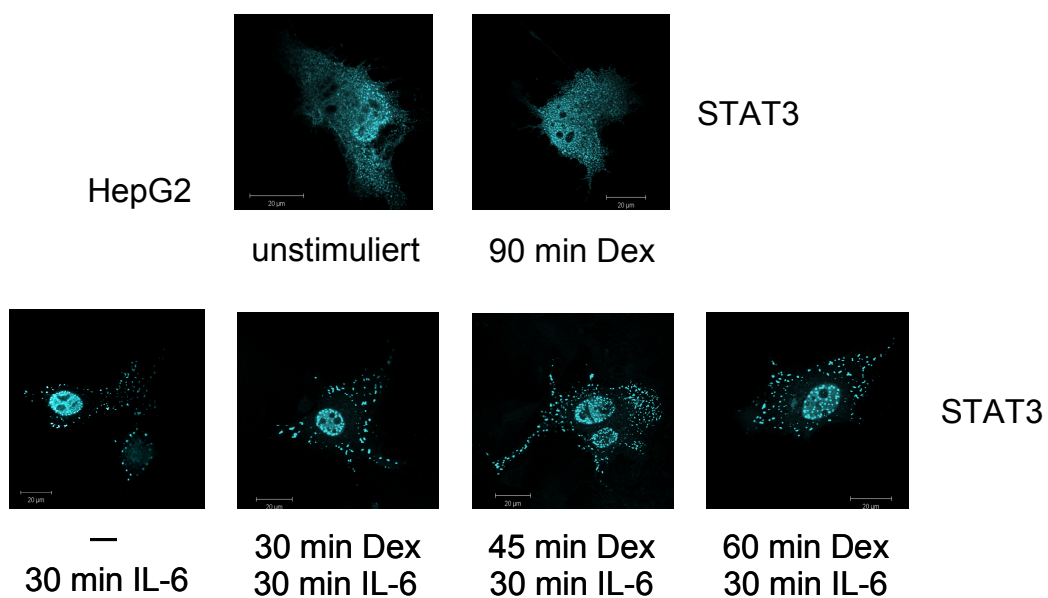
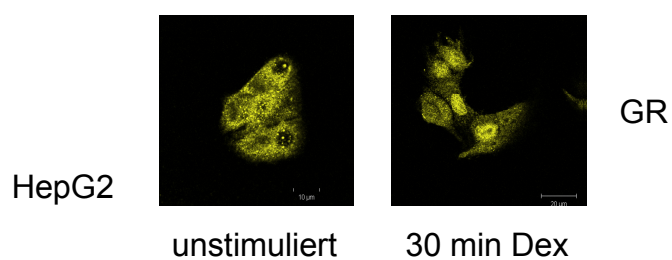
Zur Kontrolle, ob Dexamethason in der eingesetzten Konzentration wirksam war, wurde die Translokation des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) in den Nukleus untersucht. HepG2-Zellen wurden für 30 Minuten mit Dexamethason stimuliert und anschließend fixiert. Der Glucocorticoid-Rezeptor wurde mit einem spezifischen Antikörper angefärbt und die fixierten Zellen mit konfokaler Mikroskopie analysiert.

Abb. 16B zeigt, dass der Glucocorticoid-Rezeptor im unstimulierten Zustand im Cytoplasma vorliegt. Nach Stimulation mit Dexamethason kommt es zur Akkumulation des Rezeptors im Nukleus, was die Wirksamkeit von Dexamethason bestätigt.

Zusätzlich zur Analyse der Translokation von STAT3 in den Nukleus mit konfokaler Mikroskopie wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt. Dazu wurden HepG2-Zellen bis zu 30 Minuten mit Dexamethason vorbehandelt und anschließend für 30 Minuten mit IL-6 stimuliert. Sowohl das STAT3-Gesamtprotein als auch die Phosphorylierung von STAT3 wurde im Western Blot untersucht.

Abb. 16C zeigt die Ergebnisse der Zellfraktionierung. Wie die Färbungen gegen Lamin A/C und GAPDH zeigen, konnten saubere Fraktionen von Cytoplasma und Nukleus hergestellt werden. Im unstimulierten Zustand befindet sich nur eine geringe Menge an STAT3 im Nukleus. Nach IL-6-Stimulation kann STAT3 und seine

phosphorylierte Form im Nukleus nachgewiesen werden. Die zusätzliche Behandlung mit Dexamethason hat weder einen Einfluss auf das STAT3-Gesamtprotein noch auf phosphoryliertes STAT3 im Nukleus.

A**B**

C

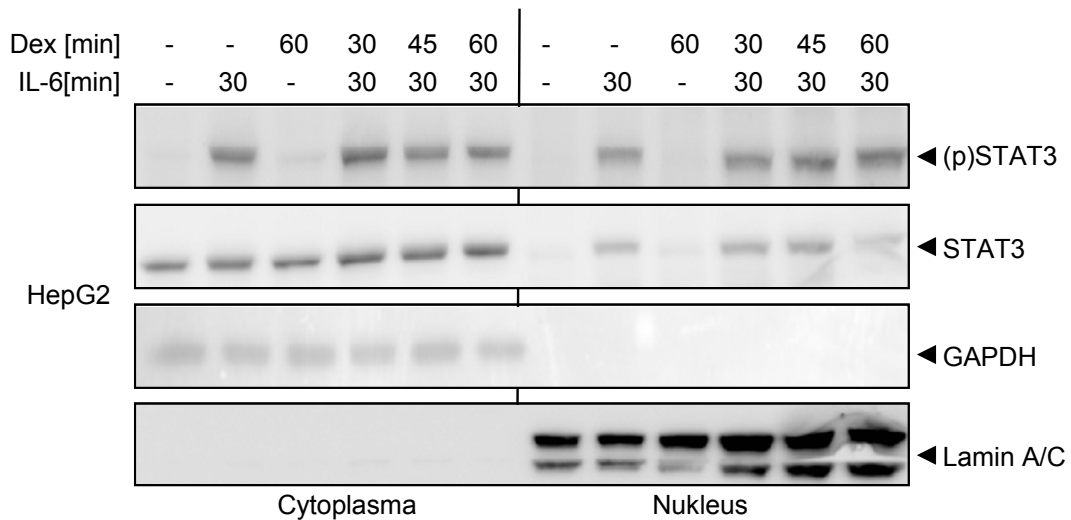


Abb. 16: Einfluss von Dexamethason auf die Translokation von STAT3 in den Zellkern

(A) HepG2-Zellen wurden mit einem Vektorkonstrukt transient transfiziert, das für STAT3, fusioniert an CFP, codiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert und anschließend mit IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ Dexamethason (1 μ M) wie angegeben stimuliert. (B) HepG2-Zellen wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert und anschließend für 30 Minuten mit Dexamethason (1 μ M) stimuliert. Der Glucocorticoid-Rezeptor wurde mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. Die Fixierung der Zellen und die Analyse mit konfokaler Mikroskopie erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. (C) HepG2-Zellen wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert und anschließend mit IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ Dexamethason (1 μ M) wie angegeben stimuliert. Die Zellfraktionierung erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Die Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern gegen STAT3 und (p)Y-STAT3 analysiert. Die Färbung von GAPDH und Lamin A/C gibt die Reinheit der einzelnen Zellfraktionen wieder. Abgebildet ist ein repräsentatives Beispiel aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

3.1.8 Glucocorticoide beeinflussen nicht die SOCS3-mRNA Expression

In der Diplomarbeit von Anna Dittrich wurde in Reporter-gen-Analysen gezeigt, dass Dexamethason keinen Einfluss auf die Aktivität des SOCS3-Promotors nach IL-6-Stimulation hat. Um zu untersuchen, ob Glucocorticoide die endogene SOCS3-mRNA Expression beeinflussen können, wurden RT-qPCR-Analysen mittels *Taqman*® PCR durchgeführt. Dazu wurden HepG2-Zellen für eine Stunde mit IL-6 und Dexamethason stimuliert.

Abb. 17 zeigt, dass IL-6 zu einer starken Expression der SOCS3-mRNA führt. Die zusätzliche Behandlung mit Dexamethason hat keinen Einfluss auf die SOCS3-mRNA Expression.

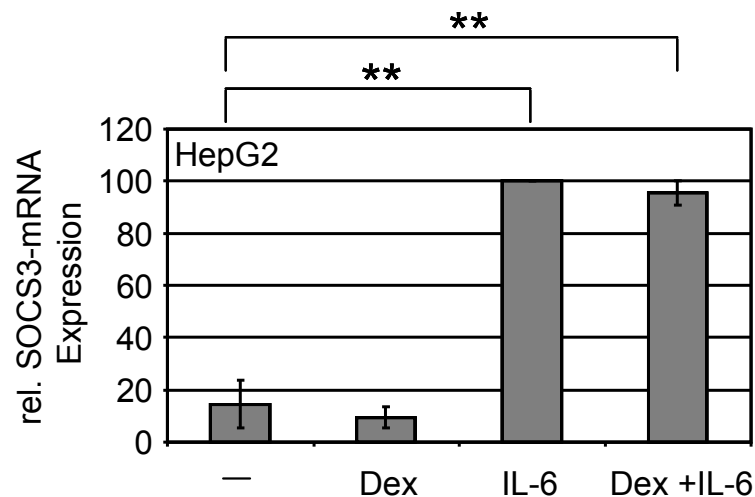


Abb. 17: Einfluss von Dexamethason auf die IL-6-induzierte SOCS3-mRNA Expression

HepG2-Zellen wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ Dexamethason (1 μ M) für eine Stunde. Nach Lyse der Zellen wurde die RNA isoliert und anschließend cDNA synthetisiert, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Expression der mRNA wurde mit spezifischen Sonden für SOCS3 und HPRT gemessen (s. Material und Methoden). Die Auswertung erfolgte nach Pfaffl. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die mRNA-Expression nach IL-6-Stimulation wurde auf 100 % gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten student's t-test: $**p \leq 0,01$.

3.1.9 Glucocorticoide beeinflussen weder die mRNA-Stabilität noch die Proteinstabilität von SOCS3

Zur Analyse, ob Glucocorticoide die IL-6-induzierte SOCS3-mRNA destabilisieren, wurden HepG2-Zellen für 60 Minuten mit IL-6 stimuliert und anschließend die Transkription mit Actinomycin D gestoppt. Die Zellen wurden mit Dexamethason behandelt und zu definierten Zeitpunkten geerntet. Die Expression der SOCS3-mRNA wurde in RT-qPCR-Analysen mittels *Taqman*® PCR untersucht.

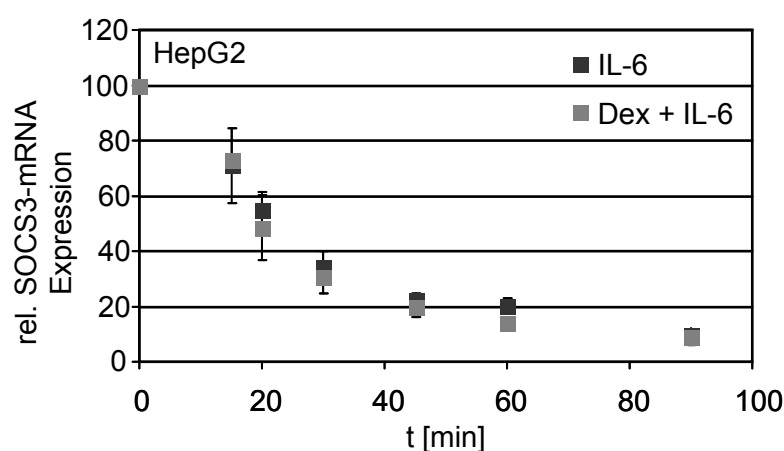
Abb. 18A zeigt, dass die Halblebenszeit der IL-6-induzierten SOCS3-mRNA ungefähr 20 Minuten beträgt. Nach 90 Minuten ist die SOCS3-mRNA nahezu komplett abgebaut. Die Kinetik der SOCS3-mRNA Degradierung wird durch Dexamethason nicht beeinflusst.

Zur Untersuchung, ob Dexamethason die Proteinstabilität von SOCS3 regulieren kann, wurden HepG2-Zellen mit einem Vektorkonstrukt transient transfiziert, welches SOCS3 unter Regulation eines Doxycyclin-abhängigen Promotors exprimiert. SOCS3 wird in Abwesenheit von Doxycyclin gebildet und nach Zugabe des Antibiotikums

wird die Expression gestoppt. Die Zellen wurden zusätzlich mit Dexamethason behandelt und die SOCS3-Proteinexpression anschließend im Western Blot untersucht.

Abb. 18B zeigt, dass die Halblebenszeit des SOCS3-Proteins zwischen 30 und 60 Minuten liegt. Nach zwei Stunden ist das Protein nahezu vollständig abgebaut. Die zusätzliche Behandlung mit Dexamethason hat keinen Einfluss auf die Kinetik des SOCS3-Proteinabbaus.

A



B

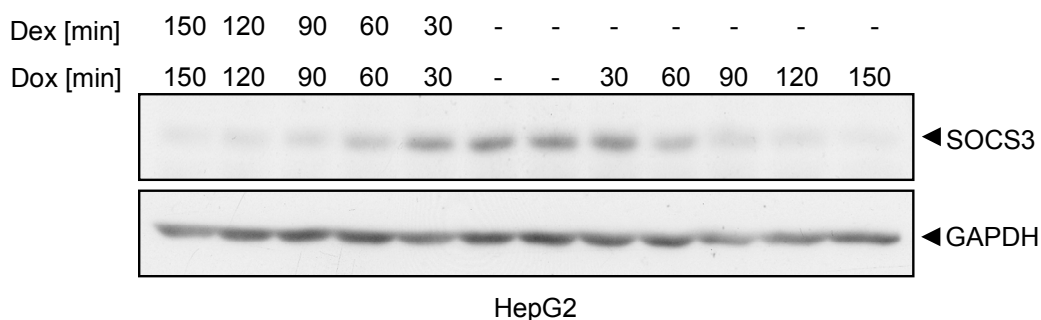


Abb. 18: Einfluss von Dexamethason auf die Stabilität der SOCS3-mRNA und des SOCS3-Proteins

(A) HepG2-Zellen wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit IL-6 (20 ng/ml) für 60 Minuten. IL-6 wurde entfernt und die Zellen mit Actinomycin D (4 μ M) behandelt. Nach 20 Minuten wurde Dexamethason (1 μ M) dazugegeben und die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Nach Lyse der Zellen wurde die RNA isoliert und anschließend cDNA synthetisiert, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Expression der mRNA wurde mit spezifischen Sonden für SOCS3 und HPRT gemessen (s. Material und Methoden). Die Auswertung erfolgte nach Pfaffl. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die mRNA-Expression nach der Behandlung mit Actinomycin D für 20 Minuten

wurde auf 100 % und Zeitpunkt 0 gesetzt. **(B)** HepG2-Zellen wurden mit einem Vektorkonstrukt transient transfiziert, welches SOCS3 unter Regulation eines Doxycyclin-abhängigen Promotors exprimiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert und anschließend mit Doxycyclin (4 µg/ml) ± Dexamethason (1 µM) für die angegebenen Zeiträume behandelt. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen SOCS3 analysiert. Als Ladungskontrolle diente die Färbung des GAPDH-Gesamtproteins. Abgebildet ist ein repräsentatives Beispiel aus n = 3 unabhängigen Experimenten, das freundlicherweise von Dr. rer. nat. Ute Albrecht, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt worden ist.

3.1.10 Die transkriptionelle Aktivität des Glucocorticoid-Rezeptors ist notwendige Voraussetzung für den Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion

Zur weiteren Aufklärung des molekularen Mechanismus, wie Glucocorticoide zur Inhibition der IL-6-induzierten SOCS3-Proteinexpression führen, wurde die Rolle des Glucocorticoid-Rezeptors genauer untersucht. Glucocorticoide können entweder transaktivierend oder transrepressorisch auf die Genexpression wirken (s. auch 1.7.1.1). Zur Unterscheidung, welche der beiden Eigenschaften des Glucocorticoid-Rezeptors für die Wirkung auf die IL-6-induzierte Genexpression verantwortlich ist, wurden die Glucocorticoid-Rezeptor Antagonisten RU-468 und ZK-216348 verwendet. Der Antagonist RU-486 inhibiert die transaktivierende Funktion des Glucocorticoid-Rezeptors und die Funktion als Transrepressor ist reduziert [63, 72]. Der Antagonist ZK-216348 gehört zur Familie der selektiven Glucocorticoid-Rezeptor Antagonisten (SEGRA). Diese Substanzen inhibieren ebenfalls die Glucocorticoid-Rezeptor-vermittelte Transaktivierung, wobei die Funktion als Transrepressor jedoch vollständig erhalten ist [107].

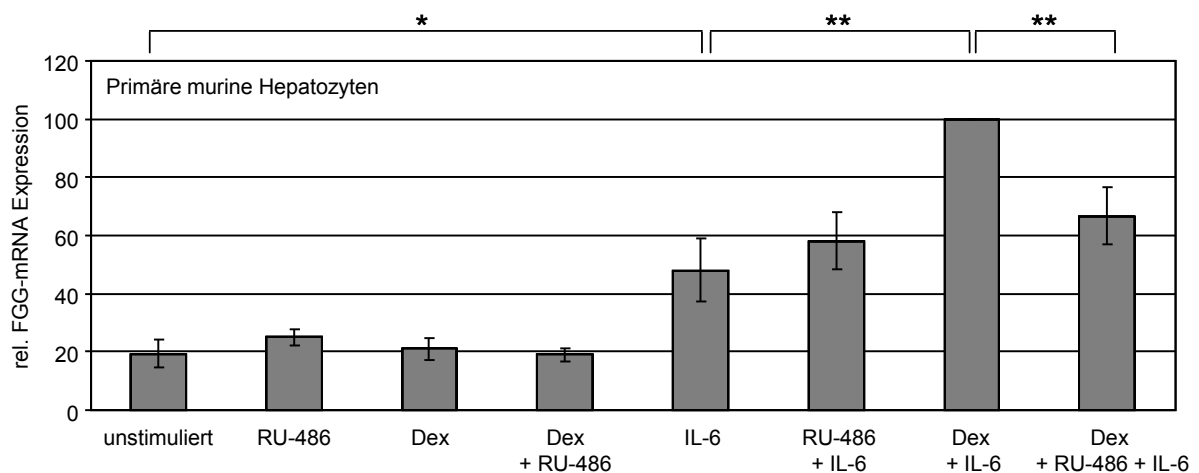
Primäre murine Hepatozyten wurden für vier Stunden mit IL-6 und Dexamethason sowie den Antagonisten RU-486 und ZK-216348 stimuliert. Die Expression der FGG-mRNA wurde in RT-qPCR-Analysen mittels *Taqman*® PCR untersucht.

Abb. 19A zeigt, dass IL-6 zu einer deutlichen Expression der FGG-mRNA führt, die bei zusätzlicher Behandlung mit Dexamethason noch gesteigert werden kann. Der Glucocorticoid-Rezeptor Antagonist RU-486 kann die IL-6-induzierte FGG-mRNA Expression nicht weiter steigern. Darüber hinaus inhibiert er bei gleichzeitiger Stimulation mit Dexamethason den verstärkenden Effekt des Glucocorticoids. Wie der Antagonist RU-486 kann auch der Antagonist ZK-216348 die IL-6-induzierte

FGG-mRNA Expression nicht weiter steigern (Abb. 19B). Im Gegensatz zu RU-486 kann ZK-216348 den Effekt von Dexamethason auf die FGG-mRNA Expression jedoch nicht signifikant aufheben.

Die transaktivierende Funktion des Glucocorticoid-Rezeptors ist somit notwendig für den Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Genexpression.

A



B

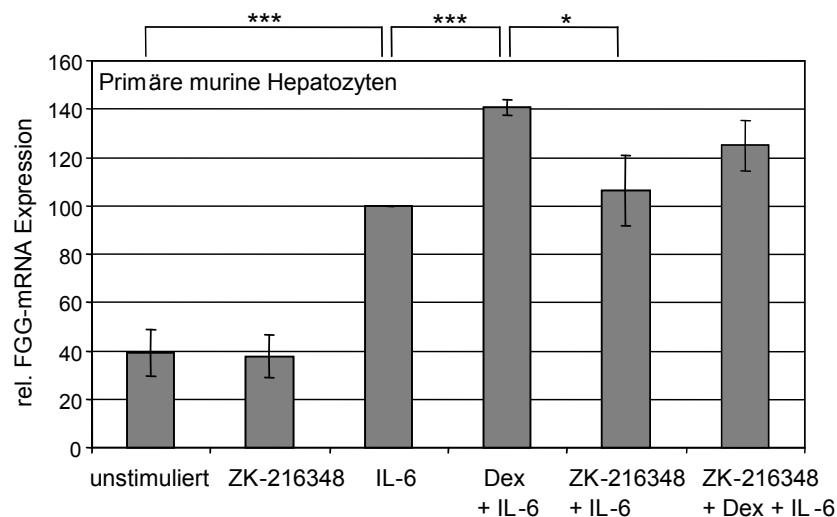


Abb. 19: Einfluss der Glucocorticoid-Rezeptor Antagonisten RU-486 und ZK-216348 auf die IL-6-induzierte Genexpression

Primäre murine Hepatozyten wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit **(A)** IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ Dexamethason (1 μ M) $\pm$ RU-486 (1 μ M) oder **(B)** IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ Dexamethason (1 μ M) $\pm$ ZK-216348 (1 μ M) für vier Stunden. Nach Lyse der Zellen wurde die RNA isoliert und anschließend cDNA synthetisiert, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Expression der mRNA wurde mit spezifischen Sonden für FGG und HPRT gemessen (s. Material und Methoden). Die Auswertung erfolgte nach Pfaffl. Die Abbildungen zeigen jeweils den Mittelwert aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die mRNA-Expression nach IL-6-Stimulation wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten student's t-test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3.2 Cross-talk zwischen Glucagon und IL-6

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von Glucagon auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion in primären murinen Hepatozyten untersucht. Die Arbeit wurde bereits als Khouri et al. publiziert [108].

3.2.1 Glucagon inhibiert die IL-6-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 ohne die Phosphorylierung von STAT3 zu beeinflussen

IL-6 führt zur Aktivierung des Jak/STAT-Signalwegs und der MAPK-Kaskade. Zur Analyse, ob einer dieser Signalwege durch Glucagon beeinflusst wird, wurden primäre murine Hepatozyten bis zu 60 Minuten mit IL-6 stimuliert und jeweils für 15 Minuten mit Glucagon vorbehandelt. Die Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 wurde im Western Blot untersucht.

Abb. 20 zeigt, dass IL-6 zur Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 führt. Die zusätzliche Behandlung mit Glucagon führt zur Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung, wobei die STAT3-Phosphorylierung unbeeinflusst bleibt. Für die densitometrische und statistische Analyse der STAT3- und ERK-Phosphorylierung s. Abb. S1 im Anhang.

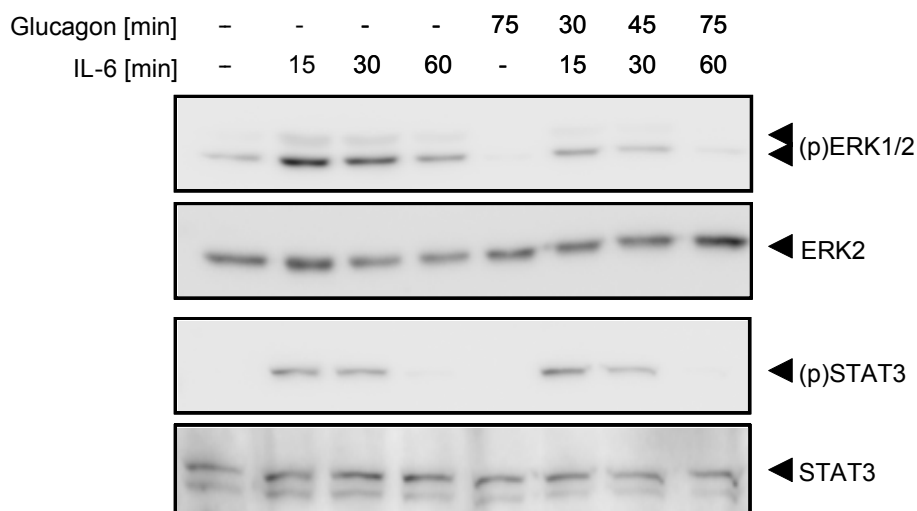


Abb. 20: Einfluss von Glucagon auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion

Primäre murine Hepatozyten wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ Glucagon (20 ng/ml) für die angegebenen Zeiten. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen p(Y) STAT3 und p(Y/T) ERK1/2 analysiert. Als Ladungskontrolle diente die Färbung des STAT3- und ERK2-Gesamtproteins. Abgebildet ist ein repräsentatives Beispiel aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Da Glucagon die IL-6-induzierte MAPK-Kaskade inhibiert, soll im Folgenden untersucht werden, ob Glucagon auch die ERK1/2-abhängige Genexpression nach IL-6-Stimulation beeinflusst.

3.2.2 Genexpressions-Analyse

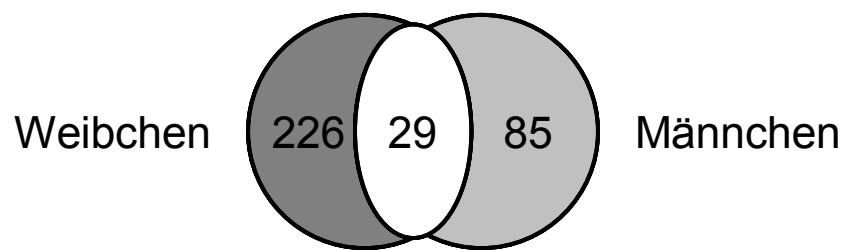
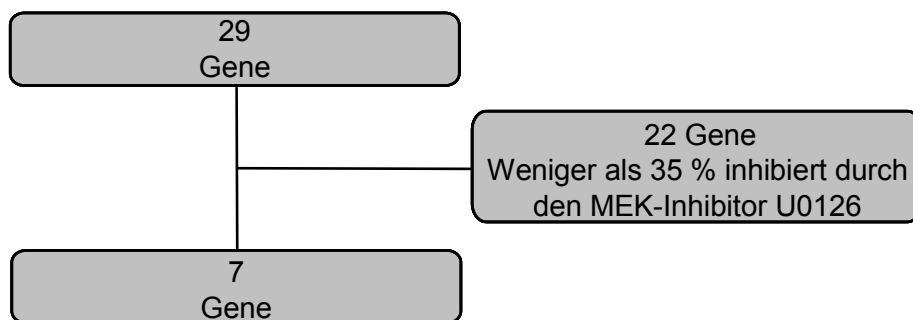
ERK1/2-abhängige IL-6-Zielgene sind noch weitgehend unbekannt. Es wurde daher eine Genexpressions-Analyse mithilfe eines *microarrays* durchgeführt. Primäre murine Hepatozyten wurden aus männlichen und weiblichen WT-Mäusen isoliert. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit dem MEK-Inhibitor U0126 vorbehandelt und anschließend für vier Stunden mit IL-6 stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und entsprechend den Herstellerangaben zur Durchführung des *microarrays* weiterbehandelt (s. 2.21).

Abb. 21A zeigt, dass in weiblichen Mäusen 226 Gene nach IL-6-Stimulation mindestens 1,5-fach im Vergleich zum unstimulierten Zustand induziert wurden. In männlichen Mäusen sind es 85 Gene. Die Schnittmenge der Gene, die in beiden Geschlechtern induziert wurden, beträgt 29. Von diesen 29 Genen wird die IL-6-induzierte Expression von sieben Genen durch den MEK-Inhibitor U0126 zu mindestens 35 % inhibiert (Abb. 21B). Die bekannten IL-6-Zielgene *FGG*, *Fibrinogen α (FGA)* und *Serpina3h*, welches das murine Homolog zum humanen α_1 -*Antichymotrypsin* (ACT) ist sowie der *feedback*-Inhibitor *SOCS3* konnten in der *microarray*-Analyse als Zielgene von IL-6 bestätigt werden (s. Tabelle S1 im Anhang). Es konnte jedoch keine Inhibition der Expression dieser Gene durch den MEK-Inhibitor U0126 nachgewiesen werden. Stattdessen konnte *Tissue factor pathway inhibitor 2* (Tfpi2), ein Serinprotease-Inhibitor, als ERK1/2-abhängiges IL-6-Zielgen identifiziert werden.

Die im *microarray* erhaltenen Daten für *FGG* und *Tfpi2* wurden validiert. Dazu wurden primäre murine Hepatozyten für 30 Minuten mit dem MEK-Inhibitor U0126 vorbehandelt und anschließend für vier Stunden mit IL-6 stimuliert. Die Expression der *FGG*- und *Tfpi2*-mRNA wurde in RT-qPCR-Analysen mittels *Taqman*® PCR untersucht.

Abb. 21C, D zeigen die mRNA-Expression von *FGG* und *Tfpi2*. IL-6 führt bei beiden Genen zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Expression. Während die IL-6-

induzierte Expression der FGG-mRNA Expression durch den MEK-Inhibitor U0126 unbeeinflusst bleibt, wird die Expression der *Tfpi2*-mRNA deutlich inhibiert. *Tfpi2* konnte somit als ERK1/2-abhängiges IL-6-Zielgen identifiziert werden.

A**B**

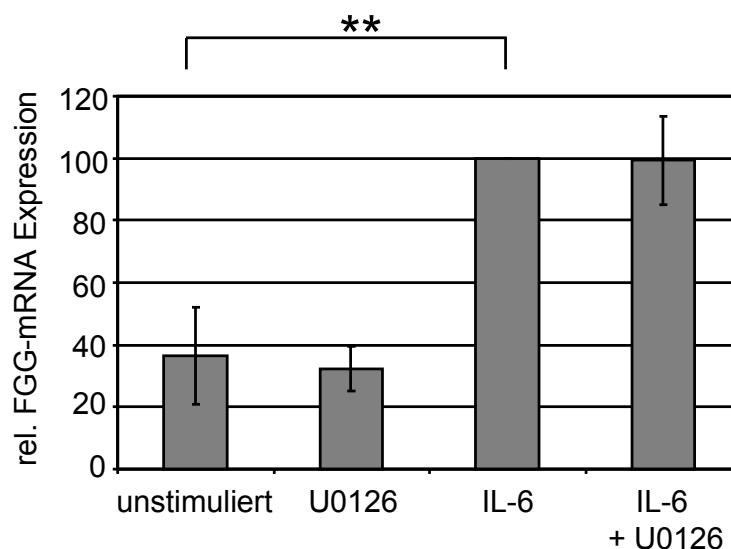
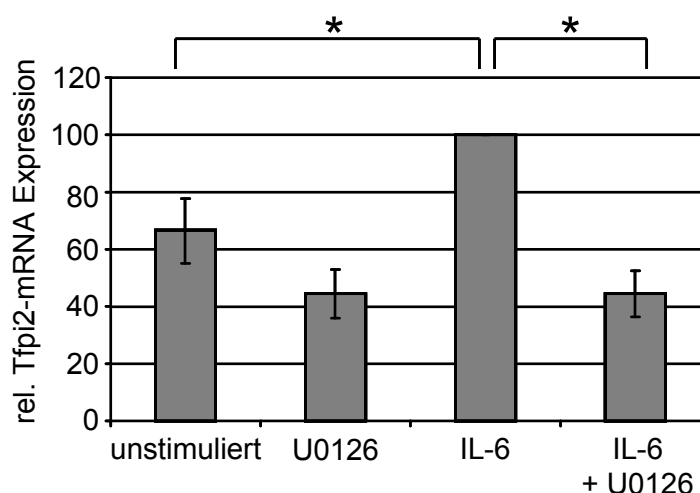
C**D**

Abb. 21: Genexpressions-Analyse

Primäre murine Hepatozyten wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit dem MEK-Inhibitor U0126 (10 μ M) vorbehandelt und anschließend für vier Stunden mit IL-6 (20 ng/ml) stimuliert. Der microarray wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. **(A)** Das Venn-Diagramm zeigt die Anzahl an Genen an, die in Hepatozyten aus weiblichen und männlichen Mäusen mindestens 1,5-fach durch IL-6 induziert wurden. **(B)** Das Flussdiagramm zeigt die Anzahl an Genen, deren IL-6-induzierte Expression zu mindestens 35 % durch den MEK-Inhibitor U0126 inhibiert wurde. **(C), (D)** Primäre murine Hepatozyten wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit dem MEK-Inhibitor U0126 (10 μ M) vorbehandelt und anschließend für vier Stunden mit IL-6 (20 ng/ml) stimuliert. Nach Stimulation und Lyse der Zellen wurde die RNA isoliert und anschließend cDNA synthetisiert, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Expression der mRNA wurde mit spezifischen Sonden für FGG, Tfp12 und HPRT gemessen (s. Material und Methoden). Die Auswertung erfolgte nach Pfaffl. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die mRNA-Expression nach IL-6-Stimulation wurde auf 100 % gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten student's t-test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

3.2.3 Der Einfluss von Glucagon auf die IL-6-induzierte Genexpression

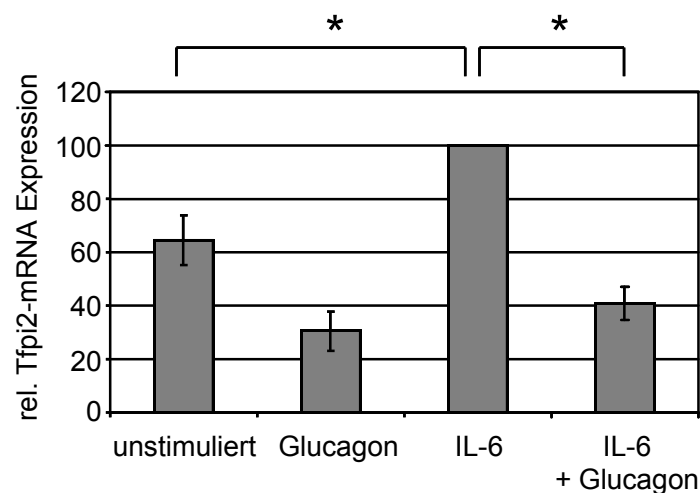
Da Glucagon zur Inhibition der IL-6-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung führt, wurde untersucht, ob Glucagon auch die Expression des ERK1/2-abhängigen Gens *Tfpi2* modulieren kann. Dazu wurden primäre murine Hepatozyten für vier Stunden mit IL-6 und Glucagon stimuliert. Die Expression der *Tfpi2*-mRNA wurde in RT-qPCR-Analysen mittels *Taqman*® PCR untersucht.

Abb. 22A zeigt, dass IL-6 zur Expression der *Tfpi2*-mRNA führt. Die zusätzliche Behandlung mit Glucagon inhibiert die IL-6-induzierte Expression der *Tfpi2*-mRNA. Neben der Inhibition der IL-6-induzierten *Tfpi2*-mRNA Expression reduziert Glucagon auch die basale Expression der *Tfpi2*-mRNA.

Für die Analyse der *Tfpi2*-Expression wurde für vier Stunden mit IL-6 stimuliert. Es wurde daher untersucht, ob Glucagon auch die späte IL-6-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung inhibieren kann. Dazu wurden primäre murine Hepatozyten für 30 Minuten mit Glucagon vorbehandelt und anschließend bis zu fünf Stunden mit IL-6 stimuliert. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde im Western Blot untersucht.

Abb. 22B zeigt, dass IL-6 zu einer transienten Phosphorylierung von ERK1/2 führt, die nach 30 Minuten Stimulation mit IL-6 maximal ist. Die zusätzliche Behandlung mit Glucagon führt bei allen Zeitpunkten zu einer Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung.

A



B

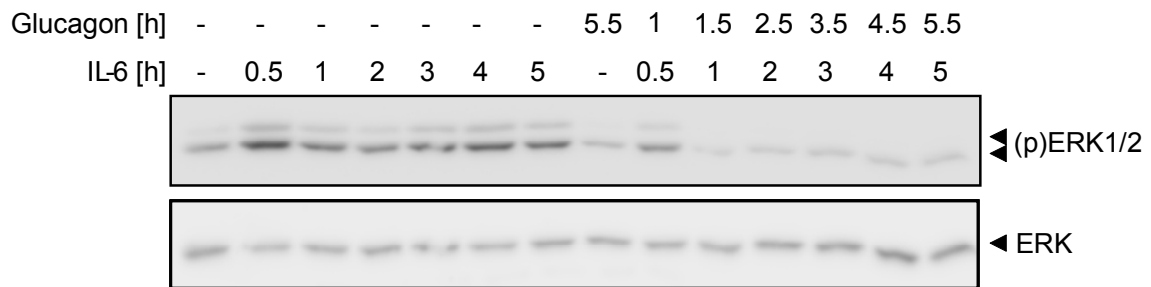


Abb. 22: Einfluss von Glucagon auf die IL-6-induzierte *Tfpi2* mRNA-Expression

Primäre murine Hepatozyten wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. **(A)** Die Stimulation mit IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ Glucagon (20 ng/ml) erfolgte für vier Stunden. Nach Lyse der Zellen wurde die RNA isoliert und anschließend cDNA synthetisiert, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Expression der mRNA wurde mit spezifischen Sonden für *Tfpi2* und HPRT gemessen (s. Material und Methoden). Die Auswertung erfolgte nach Pfaffl. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die mRNA-Expression nach IL-6-Stimulation wurde auf 100 % gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten student's t-test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. **(B)** Die Stimulation erfolgte mit IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ Glucagon (20 ng/ml) für die angegebenen Zeiten. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen p(Y/T) ERK1/2 analysiert. Als Ladungskontrolle diente die Färbung des ERK2-Gesamtproteins. Abgebildet ist ein repräsentatives Beispiel aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Die Experimente zeigen, dass Glucagon zur Inhibition der MAPK-Kaskade und zur Inhibition der IL-6-induzierten ERK1/2-abhängigen Genexpression führt. Im weiteren Verlauf der Arbeit soll daher der molekulare Mechanismus aufgeklärt werden, wie Glucagon die MAPK-Kaskade beeinflussen kann.

3.2.4 Analyse der Glucagon-induzierten Signalwege im *cross-talk* mit IL-6

Glucagon führt einerseits über die Aktivierung der Adenylatzyklase zur Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Zelle und andererseits über die Aktivierung der PLC β zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Zur Unterscheidung, welcher der beiden Signalwege bei der Inhibition der IL-6-induzierten MAPK-Kaskade eine Rolle spielt, wurden primäre murine Hepatozyten für bis zu 60 Minuten mit IL-6 stimuliert und dabei für je 15 Minuten mit Forskolin vorbehandelt. Forskolin ist ein Aktivator der Adenylatzyklase und führt zur Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Zelle. Die Phosphorylierung von ERK1/2 und STAT3 wurde im Western Blot untersucht.

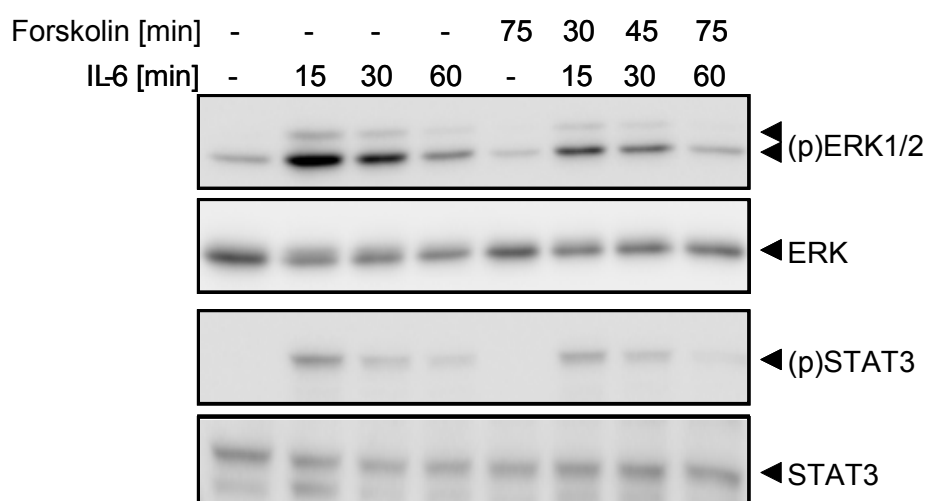
Abb. 23A zeigt, dass Forskolin den Effekt von Glucagon nachahmen kann und zu einer Inhibition der IL-6-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung führt. Die STAT3-Phosphorylierung ist nicht beeinflusst.

Zur Analyse, ob PLC β eine Rolle in dem *cross-talk* zwischen Glucagon und IL-6 spielt, wurden primäre murine Hepatozyten mit dem Kalziumionophor Ionomycin behandelt, das die Kalziumkonzentration in der Zelle erhöht. Die Zellen wurden zusätzlich bis zu 60 Minuten mit IL-6 stimuliert. Die Phosphorylierung von ERK1/2 und STAT3 wurde im Western Blot untersucht.

Abb. 23B zeigt, dass die Behandlung mit Ionomycin keinen Einfluss auf die IL-6-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung hat. Um diese Daten zu stützen, wurden primäre murine Hepatozyten mit dem PLC-Inhibitor U73122 für 30 Minuten vorbehandelt und anschließend für bis zu einer Stunde mit IL-6 und Glucagon stimuliert. Die Phosphorylierung von ERK1/2 und STAT3 wurde im Western Blot untersucht.

Abb. 23C zeigt, dass der PLC-Inhibitor U73122 die Inhibition der IL-6-induzierten ERK1/2 Phosphorylierung durch Glucagon nicht aufheben kann. Der Einfluss von Glucagon auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion beruht damit auf einer Erhöhung des cAMP-Levels in der Zelle und scheint unabhängig von dem PLC β -vermittelten Signalweg zu sein.

A



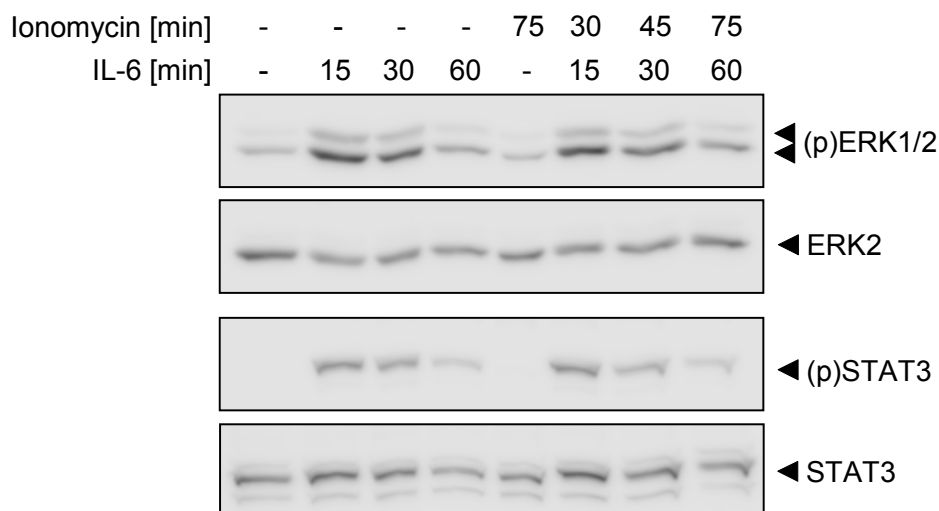
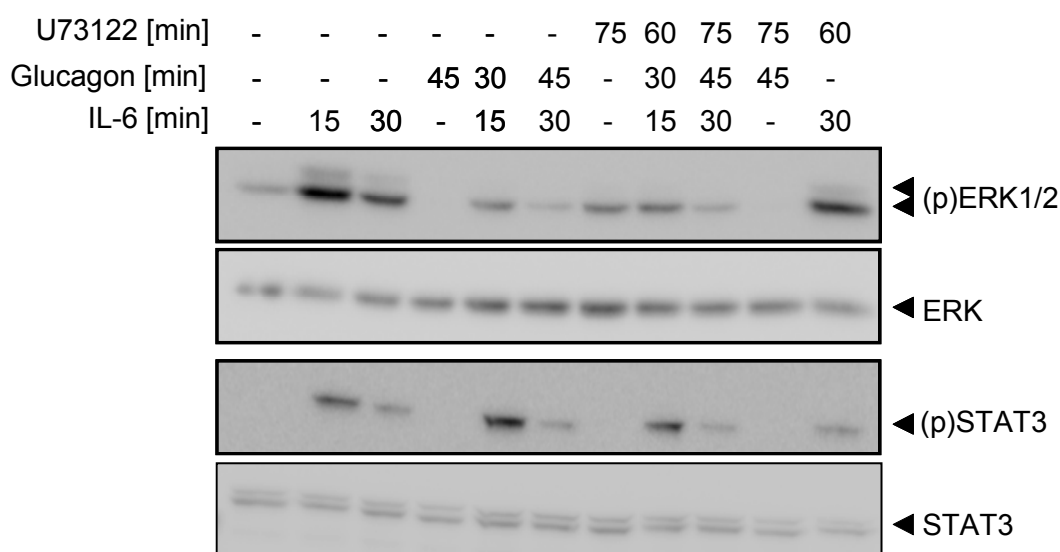
B**C**

Abb. 23: Analyse der Glucagon-induzierten Signalwege im cross-talk mit IL-6

Primäre murine Hepatozyten wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. **(A)** Die Stimulation erfolgte mit IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ Forskolin (10 μ M)) wie angegeben. **(B)** Die Stimulation erfolgte mit IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ Ionomycin (0,5 μ M) wie angegeben. **(C)** Die Zellen wurden für 30 Minuten mit dem PLC-Inhibitor U73122 (1 μ M) vorbehandelt und anschließend mit IL-6 (20 ng/ml) und Glucagon (20 ng/ml) wie angegeben stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen p(Y/T) ERK1/2 und p(Y)STAT3 analysiert. Als Ladungskontrolle diente die Färbung des ERK2- und STAT3-Gesamtproteins. Abgebildet ist je ein repräsentatives Beispiel aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten

3.2.5 Analyse der Effektormoleküle von cAMP

cAMP führt zur Aktivierung der Signalmoleküle Epac und PKA. Zur Analyse, welches der beiden Proteine im *cross-talk* zwischen Glucagon und IL-6 involviert ist, wurden primäre murine Hepatozyten mit spezifischen Agonisten für die beiden Moleküle für 15 Minuten vorbehandelt und anschließend bis zu einer Stunde mit IL-6 stimuliert. Die Phosphorylierung von ERK1/2 und STAT3 wurde im Western Blot untersucht. Abb. 24 zeigt, dass sowohl der Agonist für Epac (8-pCPT) als auch der Agonist für die PKA (6-Phe) den Effekt von Glucagon nachahmen kann und zu einer Reduktion der IL-6-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung führt. Weder der Agonist für Epac, noch der für die PKA beeinflussen die STAT3-Phosphorylierung. Sowohl Epac als auch die PKA sind somit in dem *cross-talk* zwischen Glucagon und IL-6 beteiligt.

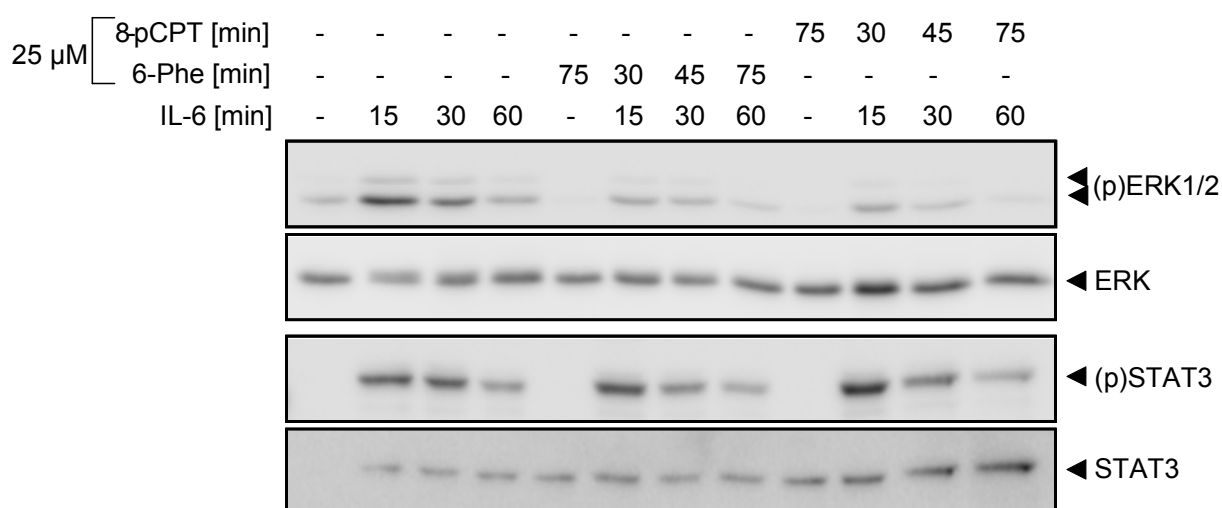


Abb. 24: Analyse der Effektormoleküle von cAMP

Primäre murine Hepatozyten wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ 6-Phe (25 μ M) $\pm$ 8-pCPT (25 μ M) wie angegeben. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen p(Y/T) ERK1/2 und p(Y)STAT3 analysiert. Als Ladungskontrolle diente die Färbung des ERK2- und STAT3-Gesamtproteins. Abgebildet ist je ein repräsentatives Beispiel aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

3.2.6 Analyse der Redundanz von Epac und PKA

Zur Analyse, ob Epac und PKA redundant in dem *cross-talk* zwischen Glucagon und IL-6 involviert sind, wurden primäre murine Hepatozyten mit einer geringeren Dosis der spezifischen Agonisten behandelt und für bis zu eine Stunde mit IL-6 stimuliert. Die Phosphorylierung von ERK1/2 und STAT3 wurde im Western Blot untersucht.

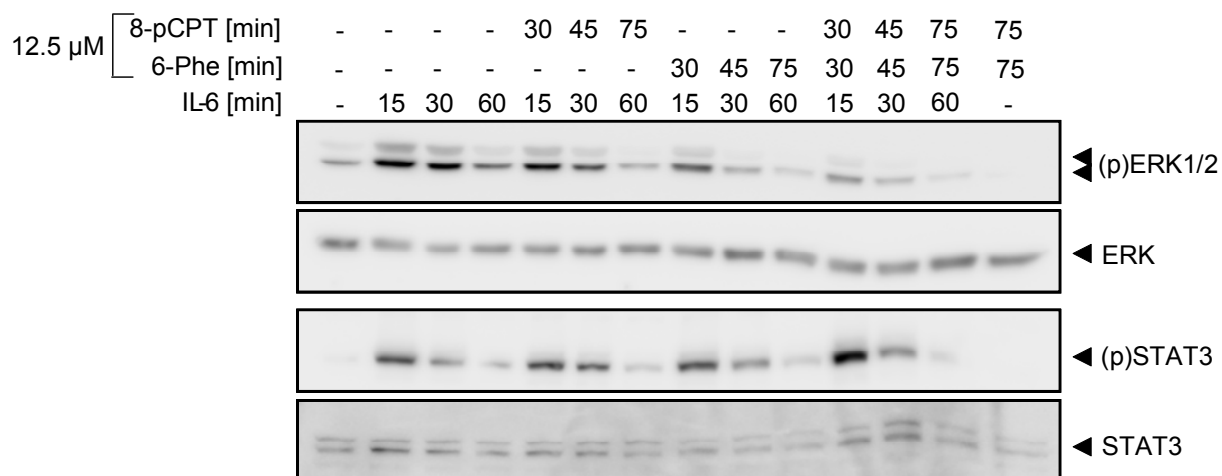
Abb. 25A zeigt, dass die spezifischen Agonisten für Epac und PKA auch in der geringeren Dosis jeweils einzeln zur Inhibition der IL-6-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung führen. Den stärksten Effekt üben sie jedoch zusammen aus. Für die densitometrische und statistische Analyse der ERK-Phosphorylierung s. Abb. S2 im Anhang.

Um die Daten zur Redundanz von Epac und PKA zu stützen, wurden primäre murine Hepatozyten mit dem PKA-Inhibitor KT-5720 für 30 Minuten vorbehandelt und anschließend bis zu einer Stunde mit IL-6 und Glucagon stimuliert. Die Phosphorylierung von ERK1/2 und STAT3 wurde im Western Blot untersucht. Abb. 25B zeigt, dass der PKA-Inhibitor KT-5720 die Inhibition der IL-6-induzierten ERK1/2 Phosphorylierung durch Glucagon nicht aufheben kann. Zur Kontrolle, ob der PKA-Inhibitor in der eingesetzten Konzentration wirksam war, wurden primäre murine Hepatozyten für 30 Minuten mit dem PKA-Inhibitor vorbehandelt und anschließend für 15 Minuten mit Glucagon stimuliert. Die Phosphorylierung von CREB, einem Substrat der PKA [109], wurde im Western Blot untersucht.

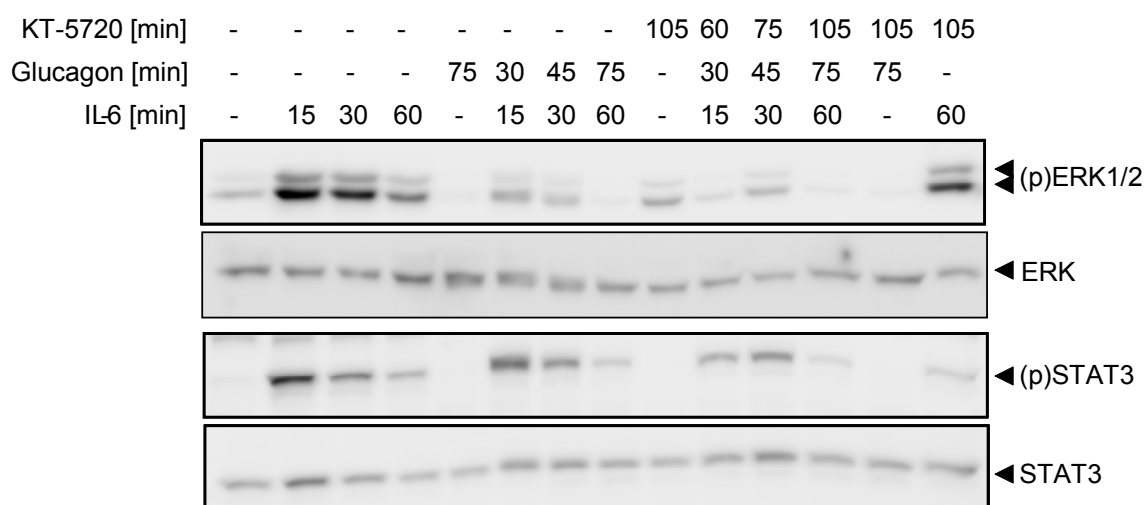
Abb. 25C zeigt, dass Glucagon zur Phosphorylierung von CREB führt. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem PKA-Inhibitor führt zur Reduktion der Glucagon-induzierten CREB-Phosphorylierung. Der PKA-Inhibitor war also in der eingesetzten Konzentration wirksam.

Die Ergebnisse sprechen für eine redundante Funktion von Epac und PKA im *cross-talk* zwischen Glucagon und IL-6.

A



B



C

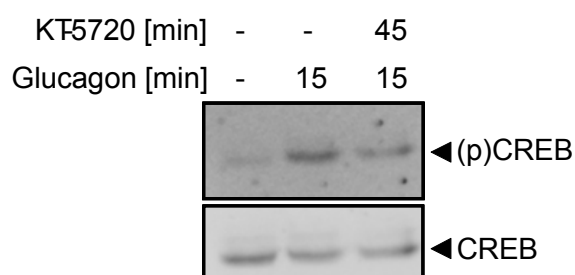


Abb. 25: Analyse der Effektormoleküle von cAMP

Primäre murine Hepatozyten wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. **(A)** Die Stimulation erfolgte mit IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ 6-Phe (12.5 μ M) $\pm$ 8-pCPT (12.5 μ M) wie angegeben. **(B)** Die Zellen wurden für 30 Minuten mit dem PKA-Inhibitor KT-5720 (1 μ M) vorbehandelt und anschließend mit IL-6 (20 ng/ml) und Glucagon (20 ng/ml) wie angegeben stimuliert. **(C)** Die Zellen wurden für 30 Minuten mit dem PKA-Inhibitor KT-5720 (1 μ M) vorbehandelt und anschließend für 15 Minuten mit Glucagon (20 ng/ml) stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen p(Y/T) ERK1/2, p(Y)STAT3 und p(S)CREB analysiert. Als Ladungskontrolle diente die Färbung des ERK2-, STAT3- und CREB-Gesamtproteins. Abgebildet ist je ein repräsentatives Beispiel aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

3.2.7 Analyse der Aktivierung von Rap1

Epac und PKA können beide die GTPase Rap1 aktivieren (s. 1.7.2.2). Zur Analyse, ob Rap1 potentiell in dem *cross-talk* zwischen Glucagon und IL-6 beteiligt ist, wurde ein Rap1 *pulldown*-Experiment durchgeführt. Dazu wurde die Rap1-bindende Domäne (RBD) des Proteins *Ral guanine nucleotide dissociation stimulator* (RalGDS) als GST-Fusionsprotein verwendet, das nur aktives, GTP-gebundenes Rap1 bindet (s. 2.15).

Primäre murine Hepatozyten wurden für 15 Minuten mit Glucagon oder den spezifischen Agonisten für Epac und PKA stimuliert. Die Aktivierung von Rap1 wurde im Western Blot untersucht.

Abb. 26A zeigt, dass Rap1 sowohl durch Glucagon als auch durch die spezifischen Agonisten für Epac und PKA aktiviert wird. Zur Überprüfung der redundanten Funktion von Epac und PKA auf Ebene der Rap1-Aktivierung, wurden primäre murine Hepatozyten für 30 Minuten mit dem PKA-Inhibitor KT-5720 vorbehandelt und anschließend für 15 Minuten mit Glucagon stimuliert. Es wurde ein Rap1-*pulldown* Experiment durchgeführt und die Aktivierung von Rap1 im Western Blot untersucht.

Abb. 26B zeigt, dass der PKA-Inhibitor die Glucagon-induzierte Aktivierung von Rap1 nicht revertieren kann. Epac und PKA führen somit redundant zur Aktivierung von Rap1 im *cross-talk* zwischen Glucagon und IL-6.

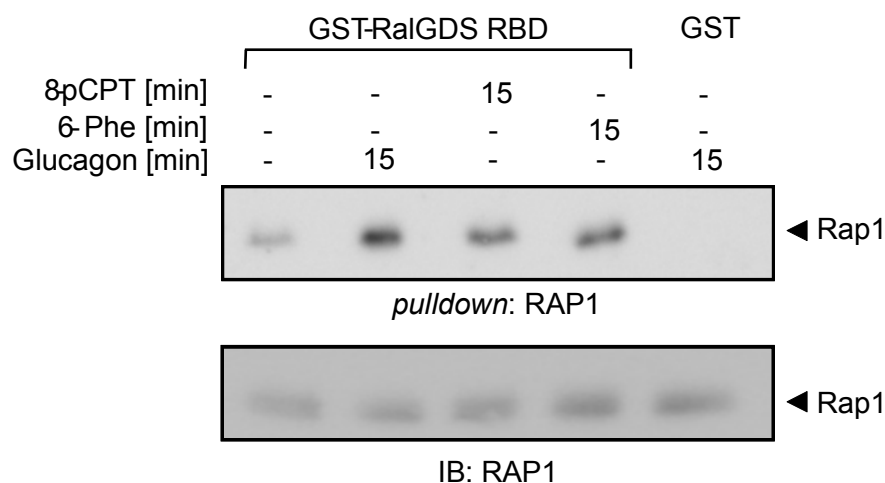
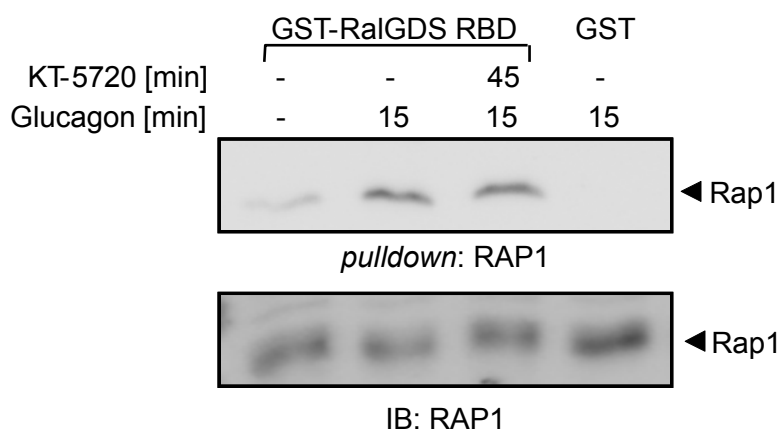
A**B**

Abb. 26: Analyse der Aktivierung von Rap1

Primäre murine Hepatozyten wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. **(A)** Die Stimulation erfolgte mit Glucagon (20 ng/ml) oder 6-Phe (25 μ M) oder 8-pCPT (25 μ M) für 15 Minuten. **(B)** Die Zellen wurden für 30 Minuten mit dem PKA-Inhibitor KT-5720 (1 μ M) vorbehandelt und anschließend für 15 Minuten mit Glucagon (20 ng/ml) stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte der Rap1-pull-down wie in Material und Methoden beschrieben. Die Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen Rap1 analysiert. Als Inputkontrolle diente die Färbung des Rap1-Gesamtproteins aus dem Gesamtzelllysat. Abgebildet ist je ein repräsentatives Beispiel aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

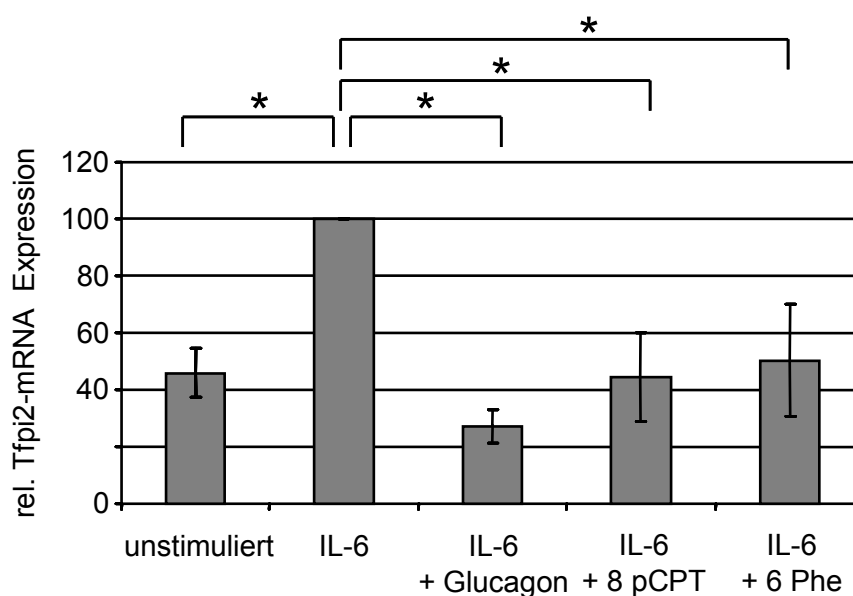
3.2.8 Analyse der Redundanz von Epac und PKA auf Ebene der IL-6-induzierten Genexpression

Zur Analyse, ob die alleinige Aktivierung von Epac und PKA ausreicht, um die IL-6-induzierte Genexpression zu inhibieren, wurden primäre murine Hepatozyten für vier Stunden mit IL-6 und Glucagon oder IL-6 und den spezifischen Agonisten für Epac und PKA stimuliert. Die Tfp2-mRNA Expression wurde in RT-qPCR-Analysen mittels *Taqman*® PCR untersucht.

Abb. 27A zeigt, dass IL-6 zur Expression der Tfp2-mRNA führt. Sowohl die Aktivierung von Epac als auch die der PKA führen zur Inhibition der IL-6-induzierten Tfp2-mRNA Expression. Zur Überprüfung der redundanten Funktion von Epac und PKA im *cross-talk* zwischen Glucagon und IL-6 auf Ebene der IL-6-induzierten Genexpression, wurden primäre murine Hepatozyten für 30 Minuten mit dem PKA-Inhibitor KT-5720 vorbehandelt und anschließend für vier Stunden mit IL-6 und Glucagon stimuliert. Die Tfp2-mRNA Expression wurde in RT-qPCR-Analysen mittels *Taqman*® PCR untersucht.

Abb. 27B zeigt, dass der PKA-Inhibitor den inhibierenden Effekt von Glucagon auf die IL-6-induzierte Genexpression nicht aufheben kann. Epac und PKA sind damit nach Aktivierung redundant in der Lage, den Effekt von Glucagon auf die IL-6-induzierte Genexpression nachzuahmen.

A



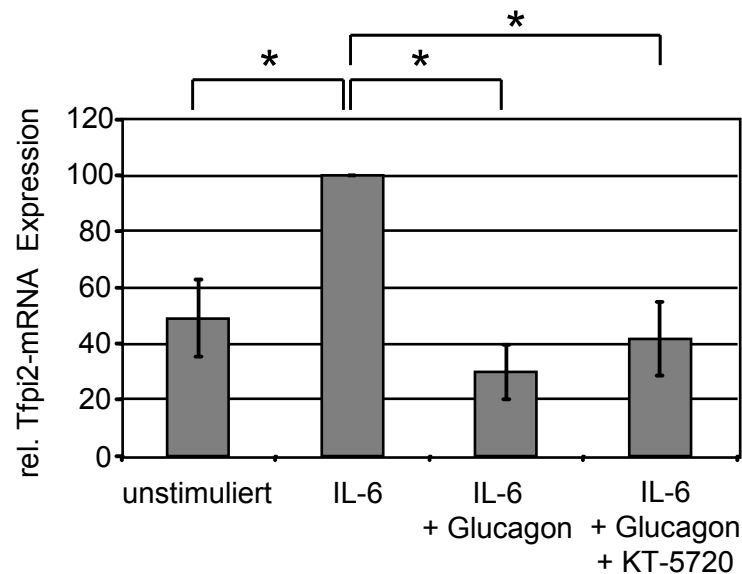
B

Abb. 27: Analyse der Redundanz von Epac und PKA auf Ebene der IL-6-induzierten Genexpression

Primäre murine Hepatozyten wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. **(A)** Die Stimulation erfolgte mit IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ Glucagon (20 ng/ml) $\pm$ 6-Phe (25 μ M) $\pm$ 8-pCPT (25 μ M) für vier Stunden. **(B)** Die Zellen wurden für 30 Minuten mit dem PKA-Inhibitor KT-5720 (1 μ M) vorbehandelt und anschließend für vier Stunden mit IL-6 (20 ng/ml) $\pm$ Glucagon (20 ng/ml) stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die RNA isoliert und anschließend cDNA synthetisiert, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Expression der mRNA wurde mit spezifischen Sonden für Tfpi2 und HPRT gemessen (s. Material und Methoden). Die Auswertung erfolgte nach Pfaffl. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die mRNA-Expression nach IL-6-Stimulation wurde auf 100 % gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten student's t-test: $*p \leq 0,05$.

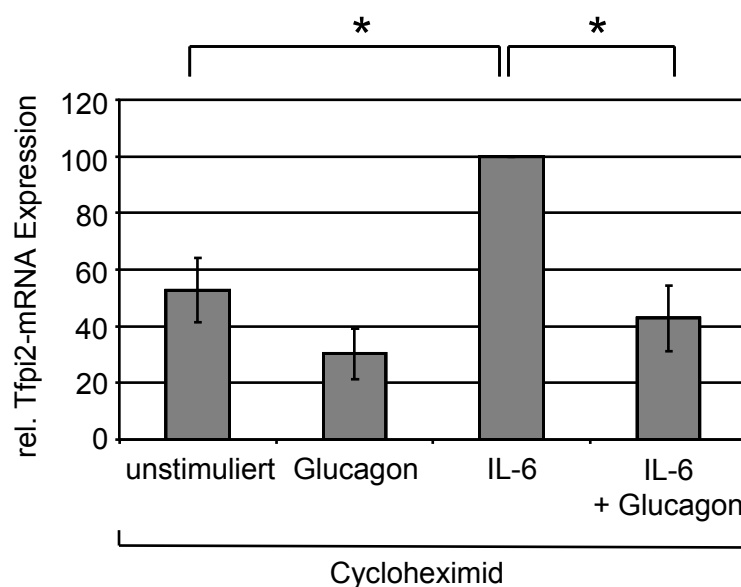
3.2.9 Der Einfluss von Glucagon auf die IL-6-induzierte Genexpression bedarf keiner Proteinneusynthese

Von verschiedenen Gruppen konnte gezeigt werden, dass cAMP SOCS3 induzieren kann [58, 96]. SOCS3 könnte somit der Mediator der Glucagon-vermittelten Inhibition der IL-6-induzierten Tfpi2-Expression sein. Zur Überprüfung, ob der Einfluss von Glucagon auf die IL-6-induzierte Genexpression die Synthese anderer Proteine, wie bspw. SOCS3, benötigt, wurden primäre murine Hepatozyten für 20 Minuten mit dem Antibiotikum Cycloheximid (CHX) behandelt, das zur Inhibition der Translation führt. Anschließend wurden die Zellen für vier Stunden mit IL-6 und Glucagon stimuliert. Die Tfpi2-mRNA Expression wurde in RT-qPCR-Analysen mittels *Taqman*® PCR untersucht.

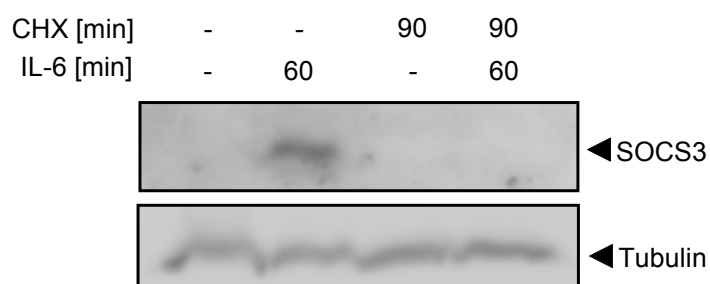
Abb. 28A zeigt, dass auch bei Behandlung der Zellen mit Cycloheximid Glucagon zur Inhibition der IL-6-induzierten Tfpi2-mRNA Expression führt. Der Einfluss von

Glucagon auf die IL-6-induzierte Genexpression bedarf damit keiner Proteinneusynthese. In Abb. 28B ist gezeigt, dass die verwendete CHX-Konzentration ausreichend ist, um die IL-6-induzierte SOCS3-Proteinexpression zu hemmen. Die Inhibition der SOCS3-Proteinexpression führt zu einer verstärkten IL-6-induzierten STAT3-Phosphorylierung, während die IL-6-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung kaum beeinflusst wird (s. Abb. 28C). Für die densitometrische und statistische Analyse der STAT3- und ERK-Phosphorylierung unter CHX-Behandlung s. Abb. S3 im Anhang.

A



B



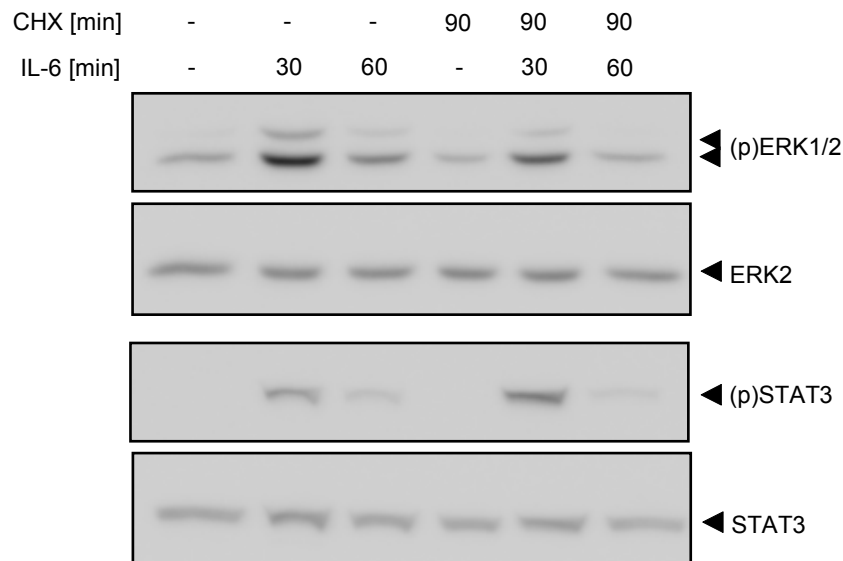
C

Abb. 28: Der Einfluss von Glucagon auf die IL-6-induzierte Genexpression bedarf keiner Proteinneusynthese

Primäre murine Hepatozyten wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. **(A)** Die Zellen wurden für 20 Minuten mit Cycloheximid (50 µg/ml) behandelt und anschließend mit IL-6 (20 ng/ml) ± Glucagon (20 ng/ml) für vier Stunden stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die RNA isoliert und anschließend cDNA synthetisiert, wie unter Material und Methoden beschrieben. Die Expression der mRNA wurde mit spezifischen Sonden für Tfp12 und HPRT gemessen (s. Material und Methoden). Die Auswertung erfolgte nach Pfaffl. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die mRNA-Expression nach IL-6-Stimulation wurde auf 100 % gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten student's t -test: $*p \leq 0,05$. **(B)** Die Zellen wurden für 20 Minuten mit Cycloheximid [50 µg/ml] behandelt und anschließend mit IL-6 (20 ng/ml) für eine Stunde stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen SOCS3 und Tubulin analysiert. Abgebildet ist ein repräsentatives Beispiel aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. **(C)** Die Zellen wurden für 20 Minuten mit Cycloheximid (50 µg/ml) behandelt und anschließend mit IL-6 (20 ng/ml) für die angegebenen Zeiten stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen p(Y/T)ERK1/2 und p(Y)STAT3 analysiert. Als Ladungskontrolle diente die Färbung des ERK2- und STAT3-Gesamtproteins. Abgebildet ist je ein repräsentatives Beispiel aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

4 Diskussion

4.1 Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der *cross-talk* zwischen Glucocorticoiden und IL-6 untersucht. Im Folgenden soll der verstärkende Effekt von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Genexpression und der zugrunde liegende molekulare Mechanismus diskutiert werden. Zuletzt wird die physiologische Relevanz des Zusammenspiels von Glucocorticoiden und IL-6 unter dem Gesichtspunkt der Reduktion der SOCS3-Expression erörtert.

4.1.1 Die Glucocorticoid-vermittelte Verstärkung der IL-6-induzierten Genexpression

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Dexamethason die IL-6-induzierte Genexpression in primären murinen Hepatozyten und in HepG2-Zellen verstärkt (s. Abb. 9). Diese Beobachtung konnte in *in vivo* Maus-Experimenten bestätigt werden (s. Abb. 15A, C). Der verstärkende Effekt von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Genexpression konnte bereits in früheren Studien nachgewiesen werden. In primären humanen Hepatozyten verstärkt Dexamethason die IL-6-induzierte Proteinsynthese von *C-reactive protein* (CRP), Fibrinogen und α_1 -Antichymotrypsin (ACT) [110]. Auch in primären Ratten-Hepatozyten und der hepatomen Rattenzelllinie H-35 führt Dexamethason zu einer Verstärkung der IL-6-induzierten Genexpression [70, 111]. Die aufgeführten Beispiele machen deutlich, dass Glucocorticoide spezieübergreifend zu einer Verstärkung der IL-6-induzierten Genexpression führen.

Obwohl der verstärkende Effekt von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Genexpression seit Ende der 1980er Jahre bekannt ist, wurden nur wenige Studien durchgeführt, um die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen aufzuklären. Einen wesentlichen Beitrag leisteten Lerner et al. [70]. Diese konnten in H-35-Zellen zeigen, dass der Glucocorticoid-Rezeptor zusammen mit STAT3 sowie den Transkriptionsfaktoren c-Jun/c-Fos und Oct-1 ein *enhanceosome* ausbilden kann. Durch die Ausbildung dieses Komplexes kommt es bei Ko-stimulation mit IL-6 und

Dexamethason zu einer verstärkten Aktivierung des α_2 -Makroglobulin (α_2 M)-Promotors im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit IL-6. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit erweitern die Daten von Lerner et al. und zeigen einen weiter greifenden Mechanismus auf, wie Glucocorticoide die IL-6-induzierte Genexpression beeinflussen können.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Dexamethason die IL-6-induzierte SOCS3-Proteinexpression inhibiert (s. Abb. 12). SOCS3 ist ein negativer *feedback*-Inhibitor der IL-6-induzierten Signaltransduktion, der hauptsächlich die Aktivierung des Jak/STAT-Signalwegs beeinträchtigt (s. 1.6.3). Die Glucocorticoid-vermittelte Reduktion der SOCS3-Expression konnte in kausalen Zusammenhang mit der beobachteten verlängerten IL-6-induzierten STAT3-Phosphorylierung nach Dexamethason-Behandlung gebracht werden (s. Abb. 11, 13A), da in SOCS3^{-/-}-Zellen Dexamethason keinen Einfluss auf die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung mehr hat (s. Abb. 13B). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der verstärkende Effekt von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion von dem SOCS3-Rekrutierungsmotiv des gp130-Rezeptors, dem Tyrosin 759, abhängt. In Hepatozyten aus Mäusen, die eine leberspezifische Mutation im SOCS3-Rekrutierungsmotiv von gp130 tragen und damit resistent gegen das SOCS3-*feedback* sind, hat Dexamethason weder einen Einfluss auf die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung (s. Abb. 14B) noch auf die IL-6-induzierte Genexpression (s. Abb. 14C). Diese Daten konnten durch *in vivo* Maus-Experimente bekräftigt werden (s. Abb. 15). In dieser Arbeit konnte daher ein Mechanismus aufgezeigt werden, der die Expression aller STAT3-abhängigen Gene nach IL-6-Stimulation beeinflussen sollte.

Die Expression der in dieser Arbeit untersuchten IL-6-Zielgene *FGG* und *SAA* ist stark von der Aktivierung von STAT3 abhängig (s. Abb. 10; [106]). Die verstärkte IL-6-induzierte Expression dieser Gene nach Dexamethason-Behandlung kann folglich auf die beobachtete verlängerte STAT3-Phosphorylierung zurückgeführt werden. Neben *FGG* und *SAA* gibt es noch weitere bekannte STAT3-abhängige Zielgene von IL-6, wie z. B. α_2 M, dessen verstärkte IL-6-induzierte Promotoraktivierung durch Dexamethason intensiv von Lerner et al. [70] untersucht worden ist (s. o.). Zur Überprüfung, ob die in dieser Arbeit beobachtete

Glucocorticoid-vermittelte SOCS3-Reduktion bei der Verstärkung der IL-6-induzierten α_2 M-Promotoraktivierung durch Dexamethason eine Rolle spielt, wurden Reporter-Gen-Analysen durchgeführt. Im Einklang mit den Daten von Lerner et al. verstärkt Dexamethason die IL-6-vermittelte Aktivierung des α_2 M-Promotors (s. Abb. S4A im Anhang). Bei Expression eines gp130-Rezeptors mit einem mutierten SOCS3-Rekrutierungsmotiv kommt es jedoch zu keiner Steigerung der IL-6-induzierten α_2 M-Promotoraktivierung durch Dexamethason (s. Abb. S4B im Anhang). Die Ergebnisse lassen erkennen, dass die in dieser Arbeit aufgezeigte Glucocorticoid-vermittelte Reduktion der SOCS3-Expression promotorspezifischen Mechanismen, wie sie von Lerner et al. postuliert werden, übergeordnet zu sein scheint.

4.1.2 Der molekulare Mechanismus der Glucocorticoid-vermittelten Inhibition der SOCS3-Expression

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Glucocorticoide die IL-6-induzierte SOCS3-Proteinexpression inhibieren können. Es wurde daher untersucht, wie Glucocorticoide zur Inhibition der SOCS3-Proteinexpression führen.

Zur IL-6-vermittelten Induktion von SOCS3 ist zu allererst die Aktivierung des IL-6R α /gp130-Rezeptorkomplexes nötig. In der Diplomarbeit von Anna Dittrich, die dieser Arbeit voraus gegangen ist, konnte gezeigt werden, dass Dexamethason weder die Oberflächenexpression des IL-6-Rezeptors α noch die des gp130-Rezeptors in HepG2-Zellen beeinflusst. Der zweite Schritt nach Aktivierung des Rezeptorkomplexes ist die Aktivierung des Jak/STAT-Signalwegs, welcher essentiell für die Expression von SOCS3 ist, da dessen Promotor stark STAT3-abhängig ist [48]. In der Diplomarbeit von Anna Dittrich konnte nachgewiesen werden, dass Dexamethason die Phosphorylierung von STAT3 nach 15, 30 und 60 Minuten Stimulation mit IL-6 nicht beeinflusst. Auf diesen Daten aufbauend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Dexamethason neben der Phosphorylierung von STAT3 auch dessen Translokation in den Nukleus nicht beeinflusst (s. Abb. 16B, C). Eine verzögerte Translokation von STAT3 in den Nukleus nach Dexamethason-Behandlung wurde in Epithelzellen der weiblichen Brust beobachtet [112]. Allerdings sind die Rahmenbedingungen der Studie sehr spezifisch, da die Rückbildung der

weiblichen Brust nach dem Abstillen an Mäusen betrachtet wird. Die Daten sind daher nur bedingt auf die Ergebnisse dieser Arbeit übertragbar.

Im Nukleus reguliert STAT3 als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen, darunter auch die von SOCS3. In der Diplomarbeit von Anna Dittrich konnte in Reporter-gen-Analysen gezeigt werden, dass Dexamethason die Aktivierung des SOCS3-Promotors in HepG2-Zellen nicht beeinflusst. In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Dexamethason die mRNA-Expression von SOCS3 in HepG2-Zellen nicht reguliert (s. Abb. 17). Paul et al. [113] hingegen beobachten in Ratten-Hepatozyten eine Reduktion der SOCS3-mRNA durch Dexamethason in Northern Blot-Experimenten. Es ist jedoch zu vermuten, dass es sich bei den unterschiedlichen Beobachtungen um speziesspezifische Effekte handelt. Dabei bedeutsam ist, dass zwei unterschiedliche Mechanismen speziessübergreifend zur Reduktion der SOCS3-Proteinexpression führen.

Bei der Regulation des Expressionslevels von Proteinen in der Zelle spielt neben der Induktion der Genexpression auch die Degradation der gebildeten mRNA und die des Proteins eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Dexamethason die mRNA-Stabilität von SOCS3 nach IL-6-Stimulation in HepG2-Zellen nicht beeinflusst (s. Abb. 18A). Für das IL-6-Zielgen *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 ist beschrieben, dass Glucocorticoide dessen mRNA-Stabilität in Zellen der glatten Muskulatur verringern [114]. Die Glucocorticoid-vermittelte Regulation ist dabei abhängig von einer spezifischen Sequenz in der 5'-untranslatierten Region (UTR) der MCP-1-mRNA. Es ist daher wahrscheinlich, dass es sich um einen genspezifischen Effekt handelt, der nicht auf die SOCS3-mRNA übertragbar ist. Einen weiter greifenden Effekt auf die Stabilität von mRNAs können Glucocorticoide durch Induktion der dualspezifischen Phosphatase MAPK-Phosphatase (MKP)-1 ausüben. MKP-1 führt zur Dephosphorylierung der MAP-Kinase p38 [115, 116], wodurch sich dessen mRNA-stabilisierende Funktion verringert [117]. Für p38 ist beschrieben, dass sie an der Regulation der SOCS3-mRNA-Stabilität beteiligt ist [118]. In dieser Arbeit kann jedoch keine Destabilisierung der SOCS3-mRNA durch Glucocorticoide beobachtet werden. Ein Grund könnten zellspezifische Effekte sein, da Ehling et al. [118] ihre Experimente zur Stabilität der SOCS3-mRNA in RAW-Makrophagen durchführten und nicht in Hepatozyten.

Neben der mRNA-Stabilität kann in dieser Arbeit auch kein Einfluss von Dexamethason auf die Proteinstabilität von SOCS3 festgestellt werden (s. Abb. 18B). Einigen Studien zufolge kann Dexamethason die Degradation von Muskelproteinen einleiten [119-121]. Dies geschieht entweder durch Induktion der Proteasen Cathepsin B und D [119] oder durch eine verstärkte mRNA-Expression von Komponenten des Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbaus [121]. Die Stabilität des SOCS3-Proteins wird über dessen Interaktion mit Elongin C reguliert (s. 1.6.3). Nach Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste von SOCS3 wird die Komplexbildung mit Elongin C aufgelöst und die Halblebenszeit von SOCS3 verkürzt sich [56]. Es wäre daher theoretisch denkbar, dass Dexamethason eine Kinase induziert, welche SOCS3 phosphorylieren könnte, wodurch sich dessen Halblebenszeit verkürzen würde. In dieser Arbeit kann jedoch kein Einfluss von Dexamethason auf die Proteinstabilität von SOCS3 nachgewiesen werden.

Da Dexamethason weder den Induktionsprozess der SOCS3-Expression noch die mRNA- oder Proteinstabilität von SOCS3 beeinflusst, wurde die Funktion des Glucocorticoid-Rezeptors im *cross-talk* mit IL-6 genauer untersucht. Wie in der Einleitung beschrieben, können Glucocorticoide entweder transaktivierend oder transrepressorisch auf die Genexpression wirken (s. 1.7.1.1). In dieser Arbeit konnte mithilfe der Glucocorticoid-Rezeptor Antagonisten RU-486 und ZK-216348 gezeigt werden, dass die transaktivierende Eigenschaft des Glucocorticoid-Rezeptors essentiell für den Einfluss von Dexamethason auf die IL-6-induzierte Genexpression ist (s. Abb. 19). Es ist daher denkbar, dass Dexamethason ein Protein oder eine oder mehrere micro (mi)-RNAs induziert, die zur Inhibition der Translation der SOCS3-mRNA führen. Diese Arbeitshypothese ist in Abb. 29 schematisch dargestellt.

In einer Studie von Rainer et al. [122] wurde gezeigt, dass Dexamethason in Lymphoma-Zellen zur Expression von miRNAs führt. Da in der vorgelegten Arbeit Hepatozyten verwendet wurden, muss in weiteren Experimenten geprüft werden, ob Dexamethason auch in Leberzellen die Expression von miRNAs induziert. In ersten *in silico*-Analysen konnten miRNAs identifiziert werden, die komplementäre Sequenzen zur 3'-UTR der SOCS3-mRNA aufweisen (www.targetscan.org). Ein Beispiel hierfür ist miR-19, eine miRNA, die in der Studie von Rainer et al. durch Dexamethason induziert wurde. In ersten Versuchen konnte in HepG2-Zellen jedoch

keine Expression der miR-19 durch Dexamethason nachgewiesen werden (präliminäre Daten, nicht gezeigt). Neben der Regulation der Translation durch miRNAs, ist auch eine Inhibition der Translation durch Einflussnahme auf die einzelnen Faktoren des Translationsapparates denkbar. In Lymphosarkoma-Zellen konnte gezeigt werden, dass Dexamethason die Translation von ribosomaler RNA inhibiert [123]. Eine verminderte Protein-Syntheserate durch Inhibition des Initiationsfaktors (eIF)-4 nach Dexamethason-Behandlung wurde in Zellen der Skelettmuskulatur beobachtet [124]. Die Beispiele machen deutlich, dass Glucocorticoide den Vorgang der Translation auf mehreren Ebenen beeinflussen können. Ob Glucocorticoide die Translation von SOCS3 hemmen können, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

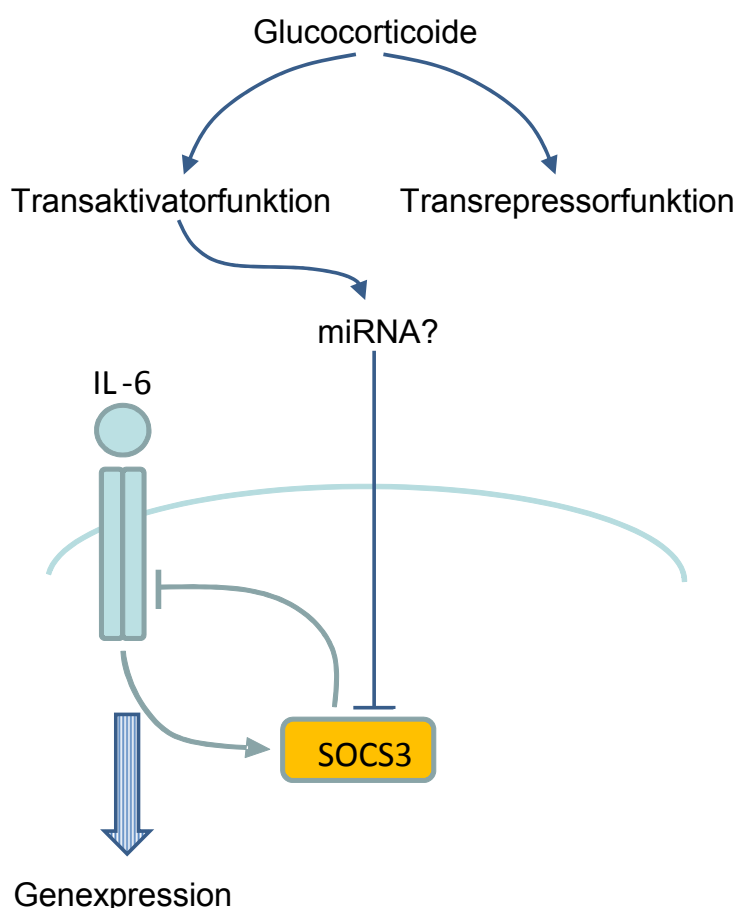


Abb. 29: Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion

Glucocorticoide führen durch Reduktion der IL-6-induzierten SOCS3-Expression zu einer verstärkten IL-6-induzierten Genexpression. Die Verstärkung der IL-6-induzierten Genexpression durch Glucocorticoide ist abhängig von der transaktivierenden Funktion des Glucocorticoid-Rezeptors. Glucocorticoide könnten daher eine oder mehrere miRNAs induzieren, die zur Inhibition der Translation der SOCS3-mRNA führen.

4.1.3 Die physiologische Bedeutung der Reduktion der SOCS3-Expression durch Glucocorticoide

Glucocorticoide werden aufgrund ihrer antiinflammatorischen Eigenschaften seit den 1950er Jahren therapeutisch für die Behandlung von entzündlichen Krankheiten, wie z. B. rheumatoider Arthritis oder Morbus Crohn genutzt. Das Cytokin IL-6 ist ein starker Induktor der Akutphase-Reaktion in der Leber und besitzt sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften. In dieser Arbeit konnte in Hepatozyten eine Reduktion der IL-6-induzierten SOCS3-Expression durch Glucocorticoide aufgezeigt werden, was in einer verstärkten IL-6-induzierten Expression der Akutphase-Gene *FGG* und *SAA* resultiert. Die Akutphase-Reaktion dient vor allem der Wiederherstellung der Körper-Homöostase bei Infektionen oder Gewebsverletzungen. Eine verlängerte Akutphase-Reaktion ist jedoch für den Körper schädlich, da sie u.a. zur Ausbildung einer chronischen Entzündung führen kann (zusammengefasst in [125]). Die fehlende Negativregulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch die, in dieser Arbeit beobachteten, Glucocorticoid-vermittelten Reduktion der SOCS3-Expression fördert damit die Ausbildung einer verlängerten Akutphase-Reaktion in der Leber. Eine stark proinflammatorische Antwort auf einen IL-6-Stimulus beobachten Croker et al. [126] in Mäusen mit einem leberspezifischen SOCS3 *knock out*, da in der Leber dieser Mäuse die Stimulation mit IL-6 zu ein dem proinflammatorischen Cytokin Interferon (IFN)- γ ähnlichen Genexpressionsmuster führt. Der in der vorgelegten Arbeit beobachtete Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion in Hepatozyten stellt damit einen Mechanismus dar, der für sich allein gesehen im Widerspruch zur antiinflammatorischen Wirkung von Glucocorticoiden steht. Neben seinen proinflammatorischen Eigenschaften fungiert IL-6 jedoch auch als antiinflammatorisches Cytokin. Es inhibiert z. B. die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Expression der proinflammatorischen Cytokine TNF- α und IL-1 β in Monozyten [127]. Durch die Inhibition der TNF- α -Produktion kommt IL-6 eine

leberschützende Funktion während einer akuten Hepatitis zu [128]. Da die durch Glucocorticoide reduzierte SOCS3-Expression die Antwort auf den IL-6-Stimulus verstärkt, sollten auch die antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-6 stärker zur Ausprägung kommen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Glucocorticoiden auf die antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-6 nicht untersucht. In fortführenden Experimenten muss daher geklärt werden, ob Glucocorticoide zu einer verstärkten antiinflammatorischen Antwort nach IL-6-Stimulation führen. Zusätzlich muss, unter dem Gesichtspunkt der therapeutischen Nutzung von Glucocorticoiden, der potentiell proinflammatorische Einfluss von Glucocorticoiden in der Leber genauer untersucht werden.

Im Gegensatz zu Leberzellen erzeugt ein SOCS3 *knock out* in Makrophagen ein antiinflammatorisches Milieu nach IL-6-Stimulation, während in WT-Makrophagen eine proinflammatorische Antwort ausgelöst wird [129]. Die Behandlung von WT-Makrophagen mit Dexamethason sollte daher ebenfalls eine antiinflammatorische Antwort auf einen IL-6-Stimulus auslösen, sofern Dexamethason in Makrophagen zu einer Reduktion der SOCS3-Expression führt. Das Beispiel verdeutlicht, dass die Folgen einer SOCS3-Reduktion in Bezug auf die IL-6 Signaltransduktion stark vom Zelltyp abhängen. Entscheidend für eine pro- oder antiinflammatorische Antwort auf einen IL-6-Stimulus ist auch, ob Zellen den IL-6R α auf ihrer Oberfläche exprimieren oder durch seine lösliche Form in *trans* aktiviert werden. Im Allgemeinen führt eine stabile Expression des IL-6R α eher zu einem antiinflammatorischen Milieu nach IL-6-Stimulation und die Signalisierung in *trans* zu einer proinflammatorischen Antwort [130]. Leberzellen exprimieren den IL-6R α auf ihrer Oberfläche. Dies gibt einen weiteren Anlass, die Untersuchung des Einflusses von Dexamethason auf die antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-6 auszuweiten.

IL-6 spielt neben seiner Rolle als Induktor der Akutphase-Reaktion in der Leber auch eine Rolle im endokrinen System. Die Ausschüttung von ACTH, welches die Synthese der Glucocorticoide in der Nebennierenrinde initiiert, wird u.a. durch IL-6 reguliert [11, 12]. Es ist beschrieben, dass die Expression von SOCS3 in der Hypophyse die Ausschüttung von ACTH hemmt [131, 132]. Eine Reduktion der SOCS3-Expression in der Hypophyse sollte daher zu einer verstärkten Ausschüttung von ACTH und damit auch zu einer verstärkten Synthese der Glucocorticoide führen.

Da Glucocorticoide in einem Regelkreis zurück auf die Hypophyse wirken, stellt der Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte SOCS3-Expression eine mögliche Erklärung dar, wie im Zuge einer Entzündung die Ausschüttung von Glucocorticoiden gesteigert werden kann. Da in dieser Arbeit jedoch keine Versuche zum Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-Signaltransduktion in der Hypophyse durchgeführt wurden, bleiben die Annahmen rein spekulativ.

4.2 Der Einfluss von Glucagon auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der *cross-talk* zwischen Glucagon und IL-6 untersucht. Zunächst sollen die Ergebnisse des Einflusses von Glucagon auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion und der zugrunde liegende molekulare Mechanismus diskutiert werden. Im Anschluss werden die Ergebnisse der Genexpressions-Analyse zur Identifikation ERK1/2-abhängiger Zielgene nach IL-6-Stimulation behandelt. Nach Diskussion des Einflusses von Glucagon auf die IL-6-induzierte Genexpression wird zum Schluss die physiologische Relevanz des Zusammenspiels von Glucagon und IL-6 erläutert.

4.2.1 Die Inhibition der IL-6-induzierten MAPK-Kaskade durch Glucagon

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Glucagon die IL-6-induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 inhibiert, wobei die Phosphorylierung von STAT3 unverändert bleibt (s. Abb. 20). Eine Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung durch Glucagon in primären murinen Hepatozyten wurde auch von einer anderen Arbeitsgruppe beobachtet [133]. Glucagon kann jedoch auch zur Phosphorylierung von ERK1/2 führen. Dies ist in Mesangialzellen der Ratte [134] und HEK293-Zellen [135] beschrieben. Der Einfluss von Glucagon auf die MAPK-Kaskade ist damit stark vom untersuchten Zelltyp abhängig.

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie Glucagon zur Inhibition der IL-6-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung in primären murinen Hepatozyten führt. Zunächst wurde analysiert, ob cAMP oder Kalzium, beides *second messenger*-Moleküle nach Glucagon-Stimulation (s. 1.7.2.1), an dem *cross-talk* mit IL-6 beteiligt sind. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Erhöhung des cAMP-Levels in der Zelle

durch Forskolin, einem Aktivator der Adenylatzyklase, zur Inhibition der MAPK-Kaskade führt (s. Abb. 23A), während die Erhöhung der Kalzium-Konzentration keine Auswirkung hat (s. Abb. 23B). Dass eine Erhöhung des cAMP-Levels in der Zelle die IL-6-induzierte MAPK-Kaskade beeinflussen kann, wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet. In HUVEC-Zellen führt die Behandlung mit Forskolin zur Inhibition der IL-6-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung [97]. Gleiches wurde in humanen Fibroblasten-Zellen nach Behandlung mit Prostaglandin E1 beobachtet [95]. Die Erhöhung des cAMP-Levels in der Zelle kann jedoch auch an der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 beteiligt sein. Dies ist in HEK293-Zellen nach Glucagon-Stimulation gezeigt worden, wobei neben der Erhöhung der cAMP-Konzentration auch die Erhöhung der Kalzium-Konzentration eine Rolle spielt [135]. Eine Beteiligung von Kalzium an der Phosphorylierung von ERK1/2 durch Glucagon wurde auch in Mesangialzellen der Ratte nachgewiesen [134]. Anhand der aufgeführten Beispiele lässt sich die Hypothese formulieren, dass in Zellen, in denen Glucagon zur Phosphorylierung von ERK1/2 führt, sowohl cAMP als auch Kalzium involviert ist. Bei einer Inhibition der MAPK-Kaskade durch Glucagon scheint cAMP eine übergeordnete Rolle zu spielen.

cAMP führt zur Aktivierung von Epac und der PKA (s. 1.7.2.2). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Aktivierung der PKA als auch die von Epac zur Inhibition der IL-6-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung in primären murinen Hepatozyten führt (s. Abb. 24). Die Art der Beteiligung der beiden Moleküle im *cross-talk* mit IL-6 ist dabei redundant (s. Abb. 25A, B). In humanen Fibroblasten-Zellen wurde eine rein PKA-abhängige Inhibition der IL-6-induzierten MAPK-Kaskade nach Prostaglandin E1-Stimulation beobachtet [95]. Da jedoch mit Prostaglandin E1 ein anderer Stimulus und mit Fibroblasten ein anderes Zellsystem verwendet wurde, stehen die Daten nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Ein rein PKA-abhängiger Einfluss nach Stimulation mit Glucagon auf die Aktivierung der MAPK-Kaskade ist in Mesangialzellen der Ratte [135] und in HEK293-Zellen gezeigt worden [134]. In beiden Studien wurden jedoch keine Versuche zur Beteiligung von Epac durchgeführt. Eine redundante Funktion von Epac und PKA kann aber dennoch ausgeschlossen werden, da die Verwendung des PKA-Inhibitors H-89 ausreicht, um den Effekt von Glucagon auf die MAPK-Kaskade zu revertieren. Da in der

vorgelegten Arbeit eine Inhibition der MAPK-Kaskade beobachtet wird, während in Mesangialzellen der Ratte und HEK293-Zellen eine Aktivierung der MAPK-Kaskade vorliegt, lässt sich vermuten, dass die Beteiligung der verschiedenen Effektormoleküle nach Glucagon-Stimulation zelltypabhängig ist. Eine synergistische Funktion von Epac und PKA ist in Zellen der glatten Muskulatur beschrieben [136]. In diesen Zellen führt cAMP zur Inhibition der Proliferation, wobei die alleinige Aktivierung der PKA oder von Epac nicht ausreicht, um den Effekt von cAMP nachzuahmen. Eine redundante Funktion von Epac und der PKA, wie sie in dieser Arbeit beobachtet werden kann, ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Die Daten dieser Arbeit zeigen daher eine neue Art des Zusammenspiels der Proteine PKA und Epac bei der Regulation zellulärer Prozesse auf.

Ein gemeinsames Zielprotein von PKA und Epac ist die GTPase Rap1 (s. 1.7.2.2). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Glucagon zur Aktivierung von Rap1 führt (s. Abb. 26A), wobei die Effektormoleküle PKA und Epac redundant involviert sind (s. Abb. 26B). Mehrere Studien belegen, dass Rap1 neben seiner Funktion als Aktivator von B-Raf als Effektormolekül bei der cAMP-vermittelten Inhibition der MAPK-Kaskade fungieren kann (vgl. 1.7.2.2). So ist z. B. in Fibroblasten-Zellen aus Ratten beschrieben, dass cAMP Rap1 aktivieren kann, was eine Inhibition der EGF-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung auslöst [137]. In NIH3T3-Zellen bindet Rap1 nach Erhöhung der cAMP-Konzentration an Raf-1, wodurch die EGF-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 inhibiert wird [90]. Die in der Literatur gut untersuchte Funktion von Rap1 bei der Inhibition der MAPK-Kaskade lässt die Schlussfolgerung zu, dass Rap1 auch in dieser Arbeit die Schlüsselrolle bei der Glucagon-induzierten Inhibition der IL-6-induzierten MAPK-Kaskade spielt. Um die Rolle von Rap1 im *cross-talk* zwischen Glucagon und IL-6 jedoch genauer charakterisieren zu können, müssen weitere Experimente durchgeführt werden.

4.2.2 ERK1/2-abhängige Zielgene von IL-6

IL-6 führt zur Aktivierung des Jak/STAT-Signalwegs und der MAPK-Kaskade (s. 1.5). Während STAT3-abhängige Zielgene von IL-6 gut untersucht sind, ist die Expression von ERK1/2-abhängigen Zielgenen nach IL-6-Stimulation noch weitgehend unerforscht. In dieser Arbeit wurde daher eine *microarray*-Analyse durchgeführt, um

ERK1/2-abhängige Zielgene nach IL-6-Stimulation in primären murinen Hepatozyten zu identifizieren.

In der *microarray*-Analyse konnten 29 Gene identifiziert werden, die sowohl in männlichen als auch in weiblichen Mäusen mindestens 1,5-fach durch IL-6 induziert wurden. In weiblichen Mäusen konnten deutlich mehr IL-6-induzierbare Gene nachgewiesen werden als in männlichen Mäusen (s. Abb. 21A). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass Männchen aufgrund ihrer aggressiven Natur bereits basal eine erhöhte Expressionsrate inflammatorischer Gene aufweisen. Ein weiterer Grund können die hormonellen Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen sein. In der Leber von männlichen und weiblichen Mäusen wurde ein hormonell-bedingter Unterschied in der mRNA-Expression der Transportproteine *major urinary proteins* (MUPs) beobachtet [138]. Durch Gabe von Testosteron an die weiblichen Mäuse konnte die Expressionsrate angeglichen werden.

Unter den 29 Genen, die sowohl in weiblichen als auch in männlichen Mäusen mindestens 1,5-fach durch IL-6 induziert wurden, konnten die bekannten IL-6-Zielgene *FGA*, *FGG*, *Serpina3h* und *SOCS3* nachgewiesen werden (s. Tabelle 1 im Anhang). Die Expression dieser Gene diente als Positivkontrolle, dass der *microarray* funktioniert hat und die Daten zur Identifikation von ERK1/2-abhängigen IL-6-Zielgenen verwendet werden konnten. Zur Identifikation von ERK1/2-abhängigen IL-6-Zielgenen wurden die Zellen mit dem MEK-Inhibitor U0126 behandelt. Die Expression der bekannten IL-6-Zielgene *FGA*, *FGG*, *Serpina3h* und *SOCS3* wurde durch Inhibition der MAPK-Kaskade nicht beeinträchtigt, was auf eine starke STAT3-Abhängigkeit dieser Gene schließen lässt. Dies wird durch Daten aus der Literatur unterstützt [34, 48, 131, 139, 140]. Von den neu identifizierten Zielgenen von IL-6 konnte bei sieben nachgewiesen werden, dass ihre Expression von der Aktivierung der MAPK-Kaskade abhängt. Zu diesen Genen zählt der Serinprotease-Inhibitor *Tfpi2*. Die Inhibition der MAPK-Kaskade reduziert die IL-6-induzierte Expression von *Tfpi2* um ungefähr 50 % (s. Abb. 21D). Die ERK1/2-Abhängigkeit des humanen *Tfpi2*-Promotors wurde in HeLa-, Hek293- und MCF-7-Zellen mithilfe von Deletionsmutanten in Reportergen-Analysen gezeigt [141]. Für die ERK1/2-abhängige Aktivierung des *Tfpi2*-Promotors scheint eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor AP-1 essentiell zu sein, dessen Untereinheit c-Fos durch

ERK1/2 phosphoryliert werden kann [142]. In Leberzellen mit einem gp130 *knock out* konnte gezeigt werden, dass die basale Expression von Tfp2 stark herunterreguliert ist [143]. Die Identifikation von Tfp2 als IL-6- und ERK1/2-abhängiges Zielgen steht damit im Einklang mit den Daten aus der Literatur.

4.2.3 Der Einfluss von Glucagon auf die IL-6-induzierte Genexpression

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Glucagon die IL-6-induzierte mRNA-Expression von Tfp2 inhibiert (s. Abb. 22A). Der Tfp2-Promotor weist kein cAMP-responsives Element (CRE) auf [141], so dass ausgeschlossen werden kann, dass Glucagon einen direkten Einfluss auf die Expression von Tfp2 ausübt. Stattdessen führt wohl die in dieser Arbeit beobachtete Inhibition der IL-6-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung durch Glucagon zur Inhibition der Tfp2-Expression, da diese stark von der Aktivierung der MAPK-Kaskade abhängig ist. Eine Inhibition der IL-6-induzierten Genexpression durch Hormone, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren signalisieren, wurde auch in humanen Fibroblasten-Zellen gezeigt. In diesen Zellen führt Prostaglandin E1 durch Inhibition der IL-6-induzierten MAPK-Kaskade zur Reprimierung der IL-6-induzierten MCP-1-Expression [95].

Neuere Studien zeigen, dass cAMP die Expression des *feedback*-Inhibitors SOCS3 induzieren kann [58, 96]. Da SOCS3 die IL-6-induzierte Signaltransduktion inhibiert, wäre es theoretisch möglich, dass Glucagon über die Induktion der SOCS3-Expression negativ auf die IL-6-induzierte Genexpression wirkt. In dieser Arbeit kann eine Beteiligung von SOCS3 jedoch ausgeschlossen werden, da Glucagon auch bei Inhibition des Translationsapparates durch das Antibiotikum Cycloheximid zur Reduktion der IL-6-induzierten Tfp2-mRNA Expression führt (s. Abb. 28A). Der Einfluss von Glucagon auf die IL-6-induzierte Genexpression ist damit unabhängig von einer *de novo* Proteinsynthese. Gegen eine Beteiligung des *feedback*-Inhibitors SOCS3 spricht auch, dass dieser hauptsächlich die Aktivierung des Jak/STAT-Signalwegs reguliert (s. Abb. 28C und S3B). In dieser Arbeit kann kein Einfluss von Glucagon auf die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung nachgewiesen werden (s. Abb. 20, 23A und S1B). Eine Reduktion der IL-6-induzierten STAT3-Phosphorylierung durch cAMP wurde in HUVEC-Zellen beobachtet [96]. Ein wesentlicher Unterschied zu dieser Arbeit besteht jedoch darin, dass in den HUVEC-

Zellen für fünf Stunden mit Forskolin stimuliert wurde und dann die STAT3-Phosphorylierung nach 30 Minuten IL-6-Stimulation untersucht worden ist. Während also in dieser Arbeit Kurzzeiteffekte von cAMP auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion untersucht wurden, zeigt die Studie in HUVEC-Zellen den Einfluss von cAMP auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion über einen längeren Stimulationszeitraum.

Bei der Aufklärung des molekularen Mechanismus, wie Glucagon zur Inhibition der IL-6-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung führt, konnte eine redundante Funktion von Epac und PKA nachgewiesen werden. Die Redundanz von Epac und PKA spiegelt sich auch auf Ebene der Inhibition der IL-6-induzierten Genexpression durch Glucagon wider. Sowohl die Aktivierung von Epac als auch die der PKA führt zur Inhibition der IL-6-induzierten Tfp2-mRNA Expression (s. Abb. 27A). Gleichsam kann die Inhibition der PKA-Aktivierung den Effekt von Glucagon auf die IL-6-induzierte Tfp2-mRNA Expression nicht revertieren (s. Abb. 27B). Die Arbeitshypothese zur Regulation der IL-6-induzierten Genexpression durch Glucagon ist schematisch in Abb. 30 dargestellt. Die genaue Rolle von Rap1 im *cross-talk* zwischen Glucagon und IL-6 muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

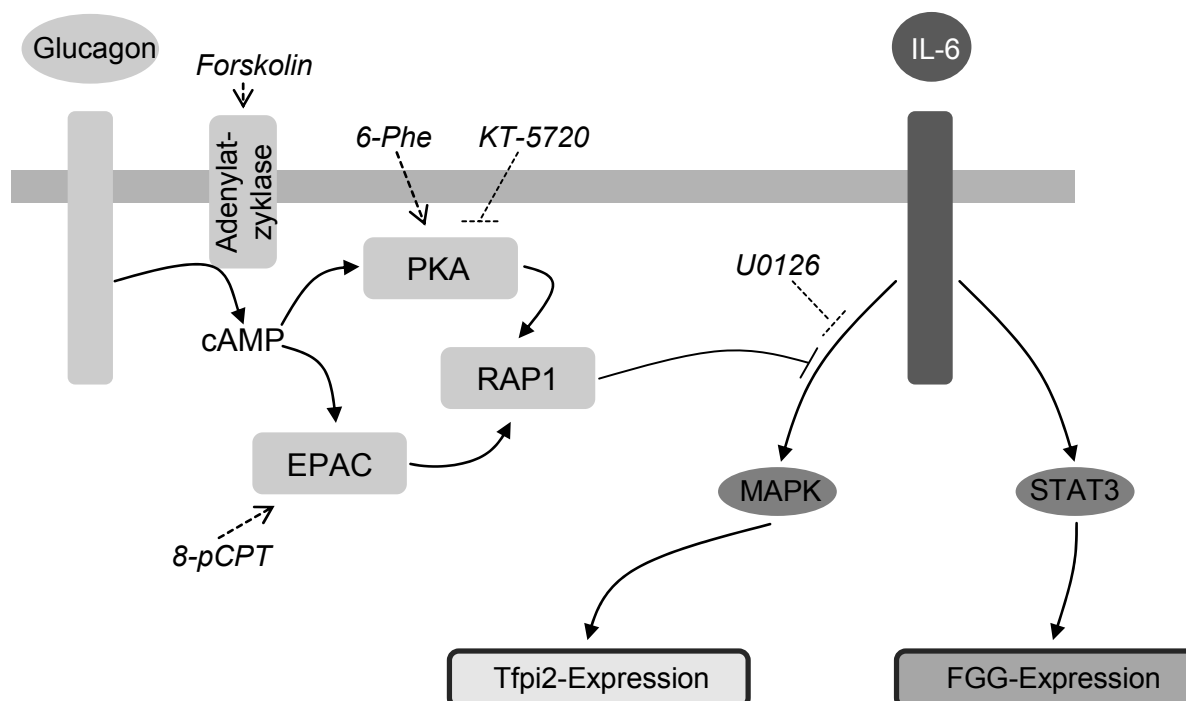


Abb. 30: Die Regulation der IL-6-induzierten Genexpression durch Glucagon (entnommen aus [108])

Glucagon führt durch Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer Erhöhung des cAMP-Niveaus in der Zelle. cAMP aktiviert PKA und Epac, welche beide zur Aktivierung der GTPase Rap1 führen. Rap1 kann die MAPK-Kaskade inhibieren [90], was in der vorgelegten Arbeit wohl zur Inhibition der ERK1/2-abhängigen IL-6-induzierten Tfp2-Expression führt. Der IL-6-induzierte Jak/STAT-Signalweg ist durch Glucagon nicht beeinflusst.

Forskolin: Aktivator der Adenylatzyklase; 6-Phe: Aktivator der PKA; 8-pCPT: Aktivator von Epac; KT-5720: Inhibitor der PKA; U0126: Inhibitor der MAP-Kinasen-Kinasen MEK1/2.

4.2.4 Die physiologische Bedeutung der Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch Glucagon

IL-6 ist ein starker Induktor der Akutphase-Reaktion in der Leber. Eine verlängerte Akutphase-Reaktion ist durch eine erhöhte Konzentration von Hormonen, wie z. B. IL-6 und Glucagon im Körper gekennzeichnet und kann zur Ausbildung einer Sepsis führen. Im Zuge einer Sepsis kommt es u.a. zu einer gestörten Glucose-Homöostase und zu einem abnormen Gerinnungsverhalten. Die Ergebnisse dieser Arbeit können zum Verständnis der molekularen Ursachen für die abnorme Gerinnung während einer Sepsis beitragen. Der Initiator der Gerinnungskaskade ist das Protein *tissue factor* (Tf), dessen Signalkaskade durch Tfp2 inhibiert wird. Während einer Sepsis ist die Expression von Tf stark erhöht und übersteigt die Expression von Tfp2, was die Ausbildung einer Thrombose fördert (zusammengefasst in [144]). Die in dieser Arbeit

beobachtete Inhibition der IL-6-induzierten Tfp2-Expression durch Glucagon könnte somit eine mögliche Erklärung für den Expressionsunterschied zwischen Tf und Tfp2 und der daraus resultierenden abnormen Gerinnung während einer Sepsis sein. In der vorgelegten Arbeit wurden jedoch keine Versuche zur Wechselwirkung von Glucagon und IL-6 unter septischen Bedingungen durchgeführt, so dass weitere Experimente notwendig sind, um die physiologischen Folgen der Inhibition der Tfp2-Expression durch Glucagon bestimmen zu können.

Frühere Studien haben sich überwiegend mit der Rolle des Jak/STAT-Signalwegs während einer Entzündung befasst. Mittlerweile ist gut untersucht, dass eine Ausgewogenheit zwischen Jak/STAT- und MAPK-Aktivierung entscheidend für den Ausgang einer Entzündung ist [145]. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Bedeutung der MAPK-Kaskade für den Verlauf einer Entzündung, da *Tfp2* ein ERK1/2-abhängiges IL-6-Zielgen und an dem abnormen Gerinnungsverhalten während einer Sepsis beteiligt ist.

Neben seiner Funktion als Induktor der Akutphase-Reaktion nimmt IL-6 auch Einfluss auf die Regulation der Glucose-Homöostase im Körper, indem es den Prozess der Gluconeogenese inhibiert. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von STAT3 essentiell für die Inhibition der Glucose-6-Phosphatase (G6Pase)-mRNA Expression, einem Schlüsselenzym der Gluconeogenese, nach IL-6-Stimulation in HepG2-Zellen und der gesamten Leber ist [146]. Im Gegenzug führt ein leberspezifischer STAT3 *knock out* zu einer verstärkten Expression der G6Pase [147]. Da Glucagon den *feedback*-Inhibitor SOCS3 induziert [58], ist es denkbar, dass Glucagon über einen längeren Zeitraum betrachtet den inhibitorischen Effekt von IL-6 auf die Gluconeogenese abschwächen könnte. In dieser Arbeit wurden keine Versuche zur Regulation der Gluconeogenese durchgeführt. Die aufgeführten Beispiele machen jedoch deutlich, dass die Wechselwirkungen von Glucagon und IL-6 sehr komplex sind und deren nähere Aufklärung neue Erkenntnisse über den Verlauf von Entzündungen und metabolischen Erkrankungen liefern könnte.

5 Zusammenfassung

5.1 Die Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch Glucocorticoide

Das Cytokin IL-6 steht im Zusammenhang mit entzündlichen Krankheiten, wie z. B. Multipler Sklerose oder rheumatoider Arthritis [15-18]. Bei der Therapie von entzündlichen Krankheiten kommen synthetische Glucocorticoide zum Einsatz, die ein breites Spektrum an antiinflammatorischen Eigenschaften aufweisen. Es ist daher wichtig, die Wechselwirkungen von IL-6 und Glucocorticoiden zu kennen und genauer zu untersuchen.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Glucocorticoide die IL-6-induzierte SOCS3-Expression in Hepatozyten inhibieren. Aufgrund des fehlenden negativen *feedbacks* durch SOCS3 führen Glucocorticoide zu einer verlängerten IL-6-induzierten STAT3-Phosphorylierung, was in einer verstärkten STAT3-abhängigen Genexpression resultiert. Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion ist dabei abhängig von dem SOCS3-Rekrutierungsmotiv Y759 des gp130-Rezeptors. In Hepatozyten, die eine Mutation im SOCS3-Rekrutierungsmotiv von gp130 tragen, haben Glucocorticoide keinen Einfluss auf die IL-6-induzierte Genexpression, obwohl die Expression von SOCS3, wie in WT-Hepatozyten, reprimiert ist. Diese *in vitro*-Daten konnten durch *in vivo*-Mausexperimente bekräftigt werden.

Bei der Aufklärung des molekularen Mechanismus, wie Glucocorticoide zur Inhibition der SOCS3-Proteinexpression führen, konnte gezeigt werden, dass der Induktionsprozess der SOCS3-Expression nicht beeinflusst ist. Darüber hinaus haben Glucocorticoide auch keinen Einfluss auf die Stabilität der SOCS3-mRNA oder des SOCS3-Proteins. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass die transaktivierende Funktion des Glucocorticoid-Rezeptors essentiell für Verstärkung der IL-6-induzierten Genexpression ist. Es ist daher zu vermuten, dass Glucocorticoide die Expression eines Proteins oder die von miRNAs induzieren, was zur Inhibition der Translation der SOCS3-mRNA führen könnte.

In dieser Arbeit konnte eine neue Art der Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch Glucocorticoide aufgezeigt werden, die aufgrund ihres universellen Charakters genspezifischen Mechanismen übergeordnet zu sein scheint. Die Daten erweitern das Verständnis der molekularen Wirkungen von Glucocorticoiden, deren Kenntnis und weitere Untersuchung unter dem Gesichtspunkt der breiten klinischen Anwendung von Glucocorticoiden von Bedeutung ist.

5.2 Die Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch Glucagon

Glucagon ist ein Gegenspieler des Insulins und führt zu einem Anstieg der Glucose-Konzentration im Blut. IL-6 übt neben seiner Funktion als inflammatorisches Cytokin auch eine regulatorische Rolle im Glucose-Metabolismus aus [13, 14, 146]. Wie Glucagon und IL-6 im Zuge einer Entzündung zusammenwirken ist bisher kaum erforscht.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Glucagon die IL-6-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung inhibiert, wobei die STAT3-Phosphorylierung unbeeinflusst bleibt. Im Rahmen der Aufklärung des molekularen Mechanismus, wie Glucagon zur Inhibition der IL-6-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung führt, konnte cAMP als ein Mediator im *cross-talk* zwischen Glucagon und IL-6 nachgewiesen werden. cAMP führt zur Aktivierung von Epac und PKA, die eine redundante Funktion in der Glucagon-vermittelten Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion aufweisen. PKA und Epac wiederum aktivieren Rap1, welches an die MAP Kinase Raf-1 binden [90] und dadurch zur Inhibition der MAPK-Kaskade führen kann.

Als ERK1/2-abhängiges Zielgen nach IL-6-Stimulation konnte in dieser Arbeit in *microarray*-Analysen der Serinprotease-Inhibitor *Tfpi2* identifiziert werden. Analog zu der Beobachtung, dass Glucagon die IL-6-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung inhibiert, wird auch die *Tfpi2*-Expression nach IL-6-Stimulation gehemmt. Die redundante Funktion von Epac und PKA im *cross-talk* zwischen Glucagon und IL-6 wird auch auf Ebene der Genexpression deutlich, da die gezielte Aktivierung der einzelnen Moleküle ausreicht, um die IL-6-induzierte *Tfpi2*-Expression zu inhibieren.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass Glucagon die

Expression des negativen *feedback*-Inhibitors SOCS3 induziert [58]. Die in dieser Arbeit beobachtete Regulation der Tfp2-Expression durch Glucagon ist jedoch unabhängig von SOCS3, da auch bei Inhibition der Proteinbiosynthese der Einfluss von Glucagon auf die IL-6-induzierte Genexpression bestehen bleibt. Darüber hinaus ist die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung durch Glucagon nicht beeinflusst.

In dieser Arbeit konnte ein neuer regulatorischer Einfluss von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion in Hepatozyten nachgewiesen werden. Die Daten erweitern das Verständnis der molekularen Wechselwirkungen von Glucagon und IL-6, was im Zusammenhang mit der Ausbildung metabolischer Erkrankungen und dem Verlauf entzündlicher Prozesse bedeutsam ist [98, 99].

6 Ausblick

6.1 Die Inhibition der IL-6-induzierten SOCS3-Proteinexpression durch Glucocorticoide

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die transaktivierende Funktion des Glucocorticoid-Rezeptors essentiell für die Verstärkung der IL-6-induzierten Genexpression durch Glucocorticoide ist. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Glucocorticoide ein Protein oder eine oder mehrere miRNAs induzieren könnten, wodurch die Translation der SOCS3-mRNA inhibiert werden würde. Ein Einfluss von miRNAs auf die Negativregulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion konnte kürzlich in HepG2-Zellen gezeigt werden, wo IL-6 eine miRNA induziert, welche die Expression des STAT3-Inhibitors PIAS3 reprimiert, was zu einer Verstärkung der IL-6-induzierten Genexpression führt [148]. Das Beispiel macht deutlich, dass miRNAs Einfluss auf die IL-6-induzierte Signalkaskaden nehmen können und deren Beteiligung im *cross-talk* zwischen Glucocorticoiden und IL-6 untersucht werden sollte.

6.2 Der Einfluss von Glucocorticoiden auf die antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-6

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Glucocorticoide die IL-6-induzierte Expression von SOCS3 in Hepatozyten inhibieren, was im Zusammenhang mit Daten aus der Literatur einen potentiell proinflammatorischen Einfluss von Glucocorticoiden darstellt [126]. Um die physiologischen Konsequenzen der Wechselwirkungen von IL-6 und Glucocorticoiden besser abschätzen zu können, muss in fortführenden Experimenten der Einfluss von Glucocorticoiden auf die antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-6 untersucht werden. IL-6 führt z. B. zur Inhibition der LPS-induzierten TNF- α - und IL-1 β -Synthese in Monozyten [127]. Es sollte überprüft werden, ob Glucocorticoide diesen inhibitorischen Effekt verstärken können. Ferner konnte in Makrophagen mit einem SOCS3 *knock out* gezeigt werden, dass die Stimulation mit IL-6 zu einer antiinflammatorischen Antwort führt [129]. In WT Makrophagen sollte daher untersucht werden, ob die Behandlung mit Glucocorticoiden ebenfalls zu einer antiinflammatorischen Antwort nach IL-6-

Stimulation führt. Dies würde zum Verständnis der molekularen Wirkungen von Glucocorticoiden beitragen.

6.3 Die Rolle von Rap1 bei der Inhibition der IL-6-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung durch Glucagon

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Glucagon zur Inhibition der IL-6-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung führt. Als Mediatoren im *cross-talk* zwischen Glucagon und IL-6 konnten cAMP sowie Epac und PKA identifiziert werden. Die Aktivierung von Rap1, ein gemeinsames Zielmolekül von Epac und PKA, konnte in dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesen werden. In der Literatur ist beschrieben, dass aktiviertes Rap1 an Raf-1 binden kann, wodurch die Aktivierung der MAPK-Kaskade unterbrochen wird [90]. Ob Rap1 nach Glucagon-Stimulation in primären murinen Hepatozyten an Raf-1 bindet, muss in weiteren Experimenten überprüft werden.

Da sowohl Epac als auch PKA Rap1 aktivieren, liegt die Vermutung nahe, dass Rap1 das zentrale Molekül in der Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch Glucagon ist. Um diese These zu überprüfen, muss die Expression von Rap1 inhibiert und anschließend untersucht werden, ob die Glucagon-vermittelte Inhibition der IL-6-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung durch den Rap1 *knock out* aufgehoben werden kann.

Literaturverzeichnis

1. Bazan, J.F., *Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(18): S. 6934-8.
2. Sprang, S.R. and J.F. Bazan, *Cytokine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement*. Curr Opin Struct Biol, 1993. **3**(6): S. 815 - 827.
3. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): S. 1-20.
4. Pflanz, S., et al., *WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27*. J Immunol, 2004. **172**(4): S. 2225-31.
5. Dillon, S.R., et al., *Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): S. 752-60.
6. Davis, S., et al., *The receptor for ciliary neurotrophic factor*. Science, 1991. **253**(5015): S. 59-63.
7. Mullberg, J., et al., *The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding*. Eur J Immunol, 1993. **23**(2): S. 473-80.
8. Müller-Newen, G., et al., *Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing*. Eur J Biochem, 1996. **236**(3): S. 837-42.
9. Kishimoto, T., et al., *Interleukin-6 family of cytokines and gp130*. Blood, 1995. **86**(4): S. 1243-54.
10. Castell, J.V., et al., *Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes*. FEBS Lett, 1988. **232**(2): S. 347-50.
11. Bethin, K.E., S.K. Vogt, and L.J. Muglia, *Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): S. 9317-22.

12. Perlstein, R.S., et al., *Synergistic roles of interleukin-6, interleukin-1, and tumor necrosis factor in the adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccharide in vivo*. *Endocrinology*, 1993. **132**(3): S. 946-52.
13. Lienenluke, B. and B. Christ, *Impact of interleukin-6 on the glucose metabolic capacity in rat liver*. *Histochem Cell Biol*, 2007. **128**(4): S. 371-7.
14. Tsigos, C., et al., *Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. **82**(12): S. 4167-70.
15. Alonzi, T., et al., *Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis*. *J Exp Med*, 1998. **187**(4): S. 461-8.
16. Eugster, H.P., et al., *IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(7): S. 2178-87.
17. Okuda, Y., et al., *IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein*. *Int Immunol*, 1998. **10**(5): S. 703-8.
18. Sasai, M., et al., *Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(8): S. 1635-43.
19. Frassanito, M.A., et al., *Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis*. *Blood*, 2001. **97**(2): S. 483-9.
20. Kawano, M., et al., *Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas*. *Nature*, 1988. **332**(6159): S. 83-5.
21. Lutticken, C., et al., *Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130*. *Science*, 1994. **263**(5143): S. 89-92.
22. Stahl, N., et al., *Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors*. *Science*, 1995. **267**(5202): S. 1349-53.
23. Schmitz, J., et al., *The cytoplasmic tyrosine motifs in full-length glycoprotein 130 have different roles in IL-6 signal transduction*. *J Immunol*, 2000. **164**(2): S. 848-54.

24. Schiemann, W.P., J.L. Bartoe, and N.M. Nathanson, *Box 3-independent signaling mechanisms are involved in leukemia inhibitory factor receptor alpha- and gp130-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase. Evidence for participation of multiple signaling pathways which converge at Ras.* J Biol Chem, 1997. **272**(26): S. 16631-6.
25. Schaper, F., et al., *Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression.* Biochem J, 1998. **335** (Pt 3): S. 557-65.
26. Lee, J.T., Jr. and J.A. McCubrey, *Targeting the Raf kinase cascade in cancer therapy - novel molecular targets and therapeutic strategies.* Expert Opin Ther Targets, 2002. **6**(6): S. 659-78.
27. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases.* Science, 2002. **298**(5600): S. 1911-2.
28. Eulenfeld, R. and F. Schaper, *A new mechanism for the regulation of Gab1 recruitment to the plasma membrane.* J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 1): S. 55-64.
29. Nishida, K., et al., *Gab-family adapter proteins act downstream of cytokine and growth factor receptors and T- and B-cell antigen receptors.* Blood, 1999. **93**(6): S. 1809-16.
30. Gille, H., et al., *ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation.* Embo J, 1995. **14**(5): S. 951-62.
31. Nakajima, T., et al., *Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(6): S. 2207-11.
32. Hof, P., et al., *Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2.* Cell, 1998. **92**(4): S. 441-50.
33. Lee, W.H., et al., *Noonan syndrome type I with PTPN11 3 bp deletion: structure-function implications.* Proteins, 2005. **58**(1): S. 7-13.
34. Kim, H., et al., *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.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(3): S. 1525-33.

35. Symes, A., et al., *The protein tyrosine phosphatase SHP-2 negatively regulates ciliary neurotrophic factor induction of gene expression*. Curr Biol, 1997. **7**(9): S. 697-700.
36. Lechleider, R.J., et al., *Activation of the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SH-PTP2 by its binding site, phosphotyrosine 1009, on the human platelet-derived growth factor receptor*. J Biol Chem, 1993. **268**(29): S. 21478-81.
37. Pluskey, S., et al., *Potent stimulation of SH-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains*. J Biol Chem, 1995. **270**(7): S. 2897-900.
38. Sugimoto, S., et al., *Activation of the SH2-containing protein tyrosine phosphatase, SH-PTP2, by phosphotyrosine-containing peptides derived from insulin receptor substrate-1*. J Biol Chem, 1994. **269**(18): S. 13614-22.
39. Gunaje, J.J. and G.J. Bhat, *Involvement of tyrosine phosphatase PTP1D in the inhibition of interleukin-6-induced Stat3 signaling by alpha-thrombin*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(1): S. 252-7.
40. Yin, T., et al., *Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and JAK tyrosine kinases*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): S. 1032-7.
41. Myers, M.P., et al., *TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B*. J Biol Chem, 2001. **276**(51): S. 47771-4.
42. Irie-Sasaki, J., et al., *CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling*. Nature, 2001. **409**(6818): S. 349-54.
43. Bousquet, C., C. Susini, and S. Melmed, *Inhibitory roles for SHP-1 and SOCS-3 following pituitary proopiomelanocortin induction by leukemia inhibitory factor*. J Clin Invest, 1999. **104**(9): S. 1277-85.
44. Yamamoto, T., et al., *The nuclear isoform of protein-tyrosine phosphatase TC-PTP regulates interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3 dephosphorylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **297**(4): S. 811-7.
45. Chung, C.D., et al., *Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3*. Science, 1997. **278**(5344): S. 1803-5.

46. Kotaja, N., et al., *PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(14): S. 5222-34.
47. Sachdev, S., et al., *PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies*. Genes Dev, 2001. **15**(23): S. 3088-103.
48. Naka, T., et al., *Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor*. Nature, 1997. **387**(6636): S. 924-9.
49. Starr, R., et al., *A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling*. Nature, 1997. **387**(6636): S. 917-21.
50. Endo, T.A., et al., *A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases*. Nature, 1997. **387**(6636): S. 921-4.
51. Sasaki, A., et al., *CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): S. 29338-47.
52. Sasaki, A., et al., *Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain*. Genes Cells, 1999. **4**(6): S. 339-51.
53. Kamura, T., et al., *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*. Genes Dev, 1998. **12**(24): S. 3872-81.
54. Zhang, J.G., et al., *The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): S. 2071-6.
55. Rui, L., et al., *SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): S. 42394-8.
56. Haan, S., et al., *Tyrosine phosphorylation disrupts elongin interaction and accelerates SOCS3 degradation*. J Biol Chem, 2003. **278**(34): S. 31972-9.
57. Haffner, M.C., et al., *Interaction and functional interference of glucocorticoid receptor and SOCS1*. J Biol Chem, 2008. **283**(32): S. 22089-96.

58. Gaudy, A.M., et al., *Suppressor of cytokine signaling-3 is a glucagon-inducible inhibitor of PKA activity and gluconeogenic gene expression in hepatocytes*. J Biol Chem, 2010. **285**(53): S. 41356-65.
59. Beck, I.M., et al., *Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases*. Endocr Rev, 2009. **30**(7): S. 830-82.
60. Mozo, L., A. Suarez, and C. Gutierrez, *Glucocorticoids up-regulate constitutive interleukin-10 production by human monocytes*. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(3): S. 406-12.
61. Collart, M.A., P. Baeuerle, and P. Vassalli, *Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(4): S. 1498-506.
62. Van den Berghe, G., *Novel insights into the neuroendocrinology of critical illness*. Eur J Endocrinol, 2000. **143**(1): S. 1-13.
63. Adcock, I.M., et al., *Ligand-induced differentiation of glucocorticoid receptor (GR) trans-repression and transactivation: preferential targetting of NF-kappaB and lack of I-kappaB involvement*. Br J Pharmacol, 1999. **127**(4): S. 1003-11.
64. Ray, A. and K.E. Prefontaine, *Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(2): S. 752-6.
65. Scheinman, R.I., et al., *Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(2): S. 943-53.
66. Konig, H., et al., *Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo*. Embo J, 1992. **11**(6): S. 2241-6.
67. Auphan, N., et al., *Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis*. Science, 1995. **270**(5234): S. 286-90.

68. Scheinman, R.I., et al., *Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids*. Science, 1995. **270**(5234): S. 283-6.
69. Stocklin, E., et al., *Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor*. Nature, 1996. **383**(6602): S. 726-8.
70. Lerner, L., et al., *STAT3-dependent enhanceosome assembly and disassembly: synergy with GR for full transcriptional increase of the alpha 2-macroglobulin gene*. Genes Dev, 2003. **17**(20): S. 2564-77.
71. Bruna, A., et al., *Glucocorticoid receptor-JNK interaction mediates inhibition of the JNK pathway by glucocorticoids*. Embo J, 2003. **22**(22): S. 6035-44.
72. Heck, S., et al., *A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1*. Embo J, 1994. **13**(17): S. 4087-95.
73. Clark, A.R., J.R. Martins, and C.R. Tchen, *Role of dual specificity phosphatases in biological responses to glucocorticoids*. J Biol Chem, 2008. **283**(38): S. 25765-9.
74. Hornbuckle, L.A., et al., *Selective stimulation of G-6-Pase catalytic subunit but not G-6-P transporter gene expression by glucagon in vivo and cAMP in situ*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **286**(5): S. E795-808.
75. Rucktaschel, A.K., D.K. Granner, and B. Christ, *Regulation by glucagon (cAMP) and insulin of the promoter of the human phosphoenolpyruvate carboxykinase gene (cytosolic) in cultured rat hepatocytes and in human hepatoblastoma cells*. Biochem J, 2000. **352 Pt 1**: S. 211-7.
76. Hers, H.G., *The control of glycogen metabolism in the liver*. Annu Rev Biochem, 1976. **45**: S. 167-89.
77. Rhee, S.G., *Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: S. 281-312.
78. D'Angelo, G., H. Lee, and R.I. Weiner, *cAMP-dependent protein kinase inhibits the mitogenic action of vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor in capillary endothelial cells by blocking Raf activation*. J Cell Biochem, 1997. **67**(3): S. 353-66.

79. Osinski, M.T. and K. Schror, *Inhibition of platelet-derived growth factor-induced mitogenesis by phosphodiesterase 3 inhibitors: role of protein kinase A in vascular smooth muscle cell mitogenesis*. Biochem Pharmacol, 2000. **60**(3): S. 381-7.
80. Scott, P.H., et al., *A regulatory role for cAMP in phosphatidylinositol 3-kinase/p70 ribosomal S6 kinase-mediated DNA synthesis in platelet-derived-growth-factor-stimulated bovine airway smooth-muscle cells*. Biochem J, 1996. **318 (Pt 3)**: S. 965-71.
81. Arslan, G. and B.B. Fredholm, *Stimulatory and inhibitory effects of adenosine A(2A) receptors on nerve growth factor-induced phosphorylation of extracellular regulated kinases 1/2 in PC12 cells*. Neurosci Lett, 2000. **292**(3): S. 183-6.
82. Iacovelli, L., et al., *Thyrotropin activates mitogen-activated protein kinase pathway in FRTL-5 by a cAMP-dependent protein kinase A-independent mechanism*. Mol Pharmacol, 2001. **60**(5): S. 924-33.
83. Kievit, P., J.D. Lauten, and R.A. Maurer, *Analysis of the role of the mitogen-activated protein kinase in mediating cyclic-adenosine 3',5'-monophosphate effects on prolactin promoter activity*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(4): S. 614-24.
84. Quilliam, L.A., et al., *Rap1A is a substrate for cyclic AMP-dependent protein kinase in human neutrophils*. J Immunol, 1991. **147**(5): S. 1628-35.
85. Schmitt, J.M. and P.J. Stork, *PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1*. Mol Cell, 2002. **9**(1): S. 85-94.
86. York, R.D., et al., *Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor*. Nature, 1998. **392**(6676): S. 622-6.
87. Dugan, L.L., et al., *Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf*. J Biol Chem, 1999. **274**(36): S. 25842-8.
88. Schmitt, J.M. and P.J. Stork, *beta 2-adrenergic receptor activates extracellular signal-regulated kinases (ERKs) via the small G protein rap1 and the serine/threonine kinase B-Raf*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): S. 25342-50.

89. Zanassi, P., et al., *cAMP-dependent protein kinase induces cAMP-response element-binding protein phosphorylation via an intracellular calcium release/ERK-dependent pathway in striatal neurons*. J Biol Chem, 2001. **276**(15): S. 11487-95.
90. Schmitt, J.M. and P.J. Stork, *Cyclic AMP-mediated inhibition of cell growth requires the small G protein Rap1*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(11): S. 3671-83.
91. Vossler, M.R., et al., *cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway*. Cell, 1997. **89**(1): S. 73-82.
92. Dhillon, A.S., et al., *Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation*. Embo J, 2002. **21**(1-2): S. 64-71.
93. Thorson, J.A., et al., *14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): S. 5229-38.
94. Wu, J., et al., *Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate*. Science, 1993. **262**(5136): S. 1065-9.
95. Sobota, R.M., et al., *Prostaglandin E1 inhibits IL-6-induced MCP-1 expression by interfering specifically in IL-6-dependent ERK1/2, but not STAT3, activation*. Biochem J, 2008. **412**(1): S. 65-72.
96. Sands, W.A., et al., *Exchange protein activated by cyclic AMP (Epac)-mediated induction of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) in vascular endothelial cells*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(17): S. 6333-46.
97. Woolson, H.D., et al., *Selective inhibition of cytokine-activated extracellular signal-regulated kinase by cyclic AMP via Epac1-dependent induction of suppressor of cytokine signalling-3*. Cell Signal, 2009. **21**(11): S. 1706-15.
98. Byerley, L.O., N.W. Alcock, and H.F. Starnes, Jr., *Sepsis-induced cascade of cytokine mRNA expression: correlation with metabolic changes*. Am J Physiol, 1992. **262**(5 Pt 1): S. E728-35.
99. Argiles, J.M. and F.J. Lopez-Soriano, *The role of cytokines in cancer cachexia*. Med Res Rev, 1999. **19**(3): S. 223-48.
100. Arcone, R., et al., *Single-step purification and structural characterization of human interleukin-6 produced in Escherichia coli from a T7 RNA polymerase expression vector*. Eur J Biochem, 1991. **198**(3): S. 541-7.

101. Weiergraber, O., et al., *Soluble human interleukin-6 receptor. Expression in insect cells, purification and characterization.* Eur J Biochem, 1995. **234**(2): S. 661-9.
102. Plum, W., et al., *Lack of glycoprotein 130/signal transducer and activator of transcription 3-mediated signaling in hepatocytes enhances chronic liver injury and fibrosis progression in a model of sclerosing cholangitis.* Am J Pathol, 2010. **176**(5): S. 2236-46.
103. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): S. e45.
104. Irizarry, R.A., et al., *Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data.* Biostatistics, 2003. **4**(2): S. 249-64.
105. Dittrich, A., Khouri, C., et al., *Glucocorticoids increase interleukin-6 dependent gene induction by interfering with the expression of the SOCS 3 feedback inhibitor.* Hepatology, 2012. **55**(1): S. 256-66.
106. Hagihara, K., et al., *IL-6 plays a critical role in the synergistic induction of human serum amyloid A (SAA) gene when stimulated with proinflammatory cytokines as analyzed with an SAA isoform real-time quantitative RT-PCR assay system.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(2): S. 363-9.
107. Schacke, H., et al., *Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): S. 227-32.
108. Khouri, C., et al., *Glucagon counteracts interleukin-6 dependent gene expression by redundant action of Epac and PKA.* Biol Chem, 2011. **392**(12): S. 1123-34.
109. Gonzalez, G.A. and M.R. Montminy, *Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133.* Cell, 1989. **59**(4): S. 675-80.
110. Castell, J.V., et al., *Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6.* Hepatology, 1990. **12**(5): S. 1179-86.

111. Otto, J.M., H.E. Grenett, and G.M. Fuller, *The coordinated regulation of fibrinogen gene transcription by hepatocyte-stimulating factor and dexamethasone*. J Cell Biol, 1987. **105**(3): S. 1067-72.
112. Bertucci, P.Y., et al., *Glucocorticoid-induced impairment of mammary gland involution is associated with STAT5 and STAT3 signaling modulation*. Endocrinology, 2010. **151**(12): S. 5730-40.
113. Paul, C., et al., *Regulation of expression of the rat SOCS-3 gene in hepatocytes by growth hormone, interleukin-6 and glucocorticoids mRNA analysis and promoter characterization*. Eur J Biochem, 2000. **267**(19): S. 5849-57.
114. Poon, M., B. Liu, and M.B. Taubman, *Identification of a novel dexamethasone-sensitive RNA-destabilizing region on rat monocyte chemoattractant protein 1 mRNA*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): S. 6471-8.
115. Imasato, A., et al., *Inhibition of p38 MAPK by glucocorticoids via induction of MAPK phosphatase-1 enhances nontypeable Haemophilus influenzae-induced expression of toll-like receptor 2*. J Biol Chem, 2002. **277**(49): S. 47444-50.
116. Kassel, O., et al., *Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1*. Embo J, 2001. **20**(24): S. 7108-16.
117. Lasa, M., et al., *Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(22): S. 7802-11.
118. Ehrling, C., et al., *Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade*. J Immunol, 2007. **178**(5): S. 2813-26.
119. Hong, D.H. and N.E. Forsberg, *Effects of dexamethasone on protein degradation and protease gene expression in rat L8 myotube cultures*. Mol Cell Endocrinol, 1995. **108**(1-2): S. 199-209.
120. May, R.C., R.A. Kelly, and W.E. Mitch, *Metabolic acidosis stimulates protein degradation in rat muscle by a glucocorticoid-dependent mechanism*. J Clin Invest, 1986. **77**(2): S. 614-21.

121. Thompson, M.G., et al., *Stimulation of myofibrillar protein degradation and expression of mRNA encoding the ubiquitin-proteasome system in C(2)C(12) myotubes by dexamethasone: effect of the proteasome inhibitor MG-132*. J Cell Physiol, 1999. **181**(3): S. 455-61.
122. Rainer, J., et al., *Glucocorticoid-regulated microRNAs and mirtrons in acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2009. **23**(4): S. 746-52.
123. Meyuhas, O., E.A. Thompson, Jr., and R.P. Perry, *Glucocorticoids selectively inhibit translation of ribosomal protein mRNAs in P1798 lymphosarcoma cells*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(8): S. 2691-9.
124. Shah, O.J., S.R. Kimball, and L.S. Jefferson, *Acute attenuation of translation initiation and protein synthesis by glucocorticoids in skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **278**(1): S. E76-82.
125. Baumann, H. and J. Gauldie, *The acute phase response*. Immunol Today, 1994. **15**(2): S. 74-80.
126. Croker, B.A., et al., *SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo*. Nat. Immunol, 2003. **4**(6): 540-5.
127. Schindler, R., et al., *Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF*. Blood, 1990. **75**(1): S. 40-7.
128. Mizuhara, H., et al., *T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6*. J Exp Med, 1994. **179**(5): S. 1529-37.
129. Yasukawa, H., et al., *IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages*. Nat Immunol, 2003. **4**(6): S. 551-6.
130. Scheller, J., et al., *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): S. 878-88.
131. Auernhammer, C.J., C. Bousquet, and S. Melmed, *Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): S. 6964-9.
132. Chesnokova, V., A. Kariagina, and S. Melmed, *Opposing effects of pituitary leukemia inhibitory factor and SOCS-3 on the ACTH axis response to inflammation*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(5): S. E1110-8.

133. Sinclair, E.M., et al., *Glucagon receptor signaling is essential for control of murine hepatocyte survival*. Gastroenterology, 2008. **135**(6): S. 2096-106.
134. Li, X.C., et al., *Glucagon receptor-mediated extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in rat mesangial cells: role of protein kinase A and phospholipase C*. Hypertension, 2006. **47**(3): S. 580-5.
135. Jiang, Y., et al., *Glucagon receptor activates extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 via cAMP-dependent protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): S. 10102-7.
136. Hower, R.C., et al., *PKA and Epac synergistically inhibit smooth muscle cell proliferation*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(1): S. 87-98.
137. Cook, S.J. and F. McCormick, *Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf*. Science, 1993. **262**(5136): S. 1069-72.
138. McIntosh, I. and J.O. Bishop, *Differential expression in male and female mouse liver of very similar mRNAs specified by two group 1 major urinary protein genes*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(5): S. 2202-7.
139. Baker, C., et al., *SERPINA3 (aka alpha-1-antichymotrypsin)*. Front Biosci, 2007. **12**: S. 2821-35.
140. Zhang, Z., N.L. Fuentes, and G.M. Fuller, *Characterization of the IL-6 responsive elements in the gamma fibrinogen gene promoter*. J Biol Chem, 1995. **270**(41): S. 24287-91.
141. Kast, C., M. Wang, and M. Whiteway, *The ERK/MAPK pathway regulates the activity of the human tissue factor pathway inhibitor-2 promoter*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): S. 6787-94.
142. Murphy, L.O., et al., *Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(8): S. 556-64.
143. Hisaka, T., et al., *Expression of tissue factor pathway inhibitor-2 in murine and human liver regulation during inflammation*. Thromb Haemost, 2004. **91**(3): S. 569-75.
144. DelGiudice, L.A. and G.A. White, *The role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in health and disease states*. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio), 2009. **19**(1): S. 23-9.

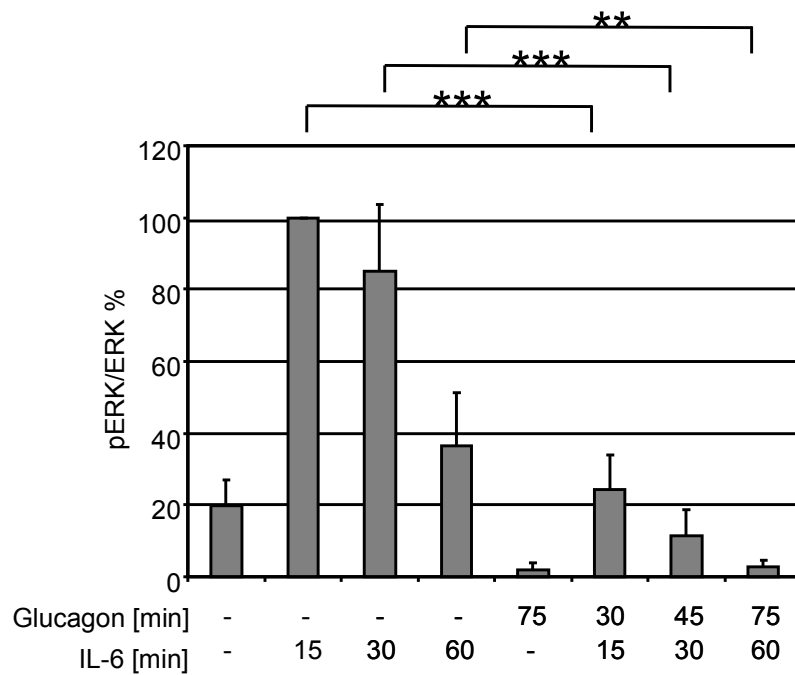
145. Ernst, M. and B.J. Jenkins, *Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130*. Trends Genet, 2004. **20**(1): S. 23-32.
146. Ramadoss, P., et al., *STAT3 targets the regulatory regions of gluconeogenic genes in vivo*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(6): S. 827-37.
147. Inoue, H., et al., *Role of STAT-3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo*. Nat Med, 2004. **10**(2): S. 168-74.
148. Brock, M., et al., *MicroRNA-18a enhances the IL-6 mediated production of the acute-phase proteins fibrinogen and haptoglobin in human hepatocytes*. J Biol Chem, 2011. **286**(46): S. 40142-50.

Anhang

Tab. S1: Gene, die sowohl in Hepatozyten aus weiblichen als auch aus männlichen Mäusen mindestens 1,5 fach durch IL-6 induziert werden.

Gensymbol	Genname	IL-6
Fermt1	<i>fermitin family homolog 1</i>	3,37
Il33	Interleukin-33	3,19
Fga	Fibrinogen α	2,34
Havcr1	<i>hepatitis A virus cellular receptor 1</i>	2,22
Jag1	<i>jagged 1</i>	2,13
Rdh10	Retinol Dehydrogenase	2,12
Mmp13	Matrix Metalloproteinase 13	2,05
Tfpi2	<i>Tissue factor pathway inhibitor-2</i>	1,96
Slc39a10	<i>solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10</i>	1,91
Cdh17	Cadherin 17	1,89
Timp1	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 1</i>	1,89
OTTMUSG00000015351	<i>predicted gene 14005 (miscRNA)</i>	1,88
Lrrc8c	<i>leucine rich repeat containing 8 family, member C</i>	1,79
Fgg	Fibrinogen γ	1,75
Fam110c	<i>family with sequence similarity 110, member C</i>	1,74
Tnfrsf26	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 26</i>	1,74
Nt5e	<i>5' nucleotidase, ecto</i>	1,72
Acvr1	<i>activin A receptor, type 1</i>	1,68
Creb3l2	<i>cAMP responsive element binding protein 3-like 2</i>	1,65
Serpina3h	<i>serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3H</i>	1,64
Cyp26a1	<i>cytochrome P450, family 26, subfamily a, polypeptide 1</i>	1,64
Fam83a	<i>family with sequence similarity 83, member A</i>	1,63
Prelp	<i>proline arginine-rich end leucine-rich repeat</i>	1,61
D18Ert653e	<i>DNA segment, Chr 18, ERATO Doi 653 (predicted)</i>	1,60
1810011O10Rik	<i>RIKEN cDNA 1810011^o10 gene (provisional)</i>	1,60
Stom	Stomatin	1,57
Sox9	<i>SRY-box containing gene 9</i>	1,57
Rasl12	<i>RAS-like, family 12</i>	1,55
Socs3	<i>suppressor of cytokine signalling-3</i>	1,54

S1A



S1B

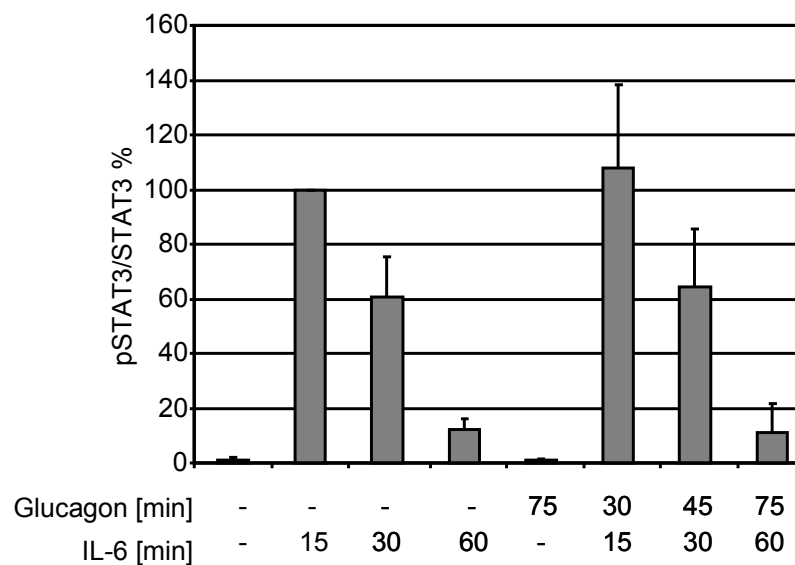


Abb. S1: Densitometrische Analyse der IL-6-induzierten ERK1/2- und STAT3-Phosphorylierung (vgl. Abb. 20)

Die densitometrische Analyse des Western Blots wurde wie unter Material und Methoden angegeben durchgeführt. Die Abbildungen zeigen je den Mittelwert aus $n = 5$ unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die Phosphorylierung von (A) ERK und (B) STAT3 nach 15 Minuten IL-6-Stimulation wurde auf 100 % gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten student's t-test: $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$.

S2

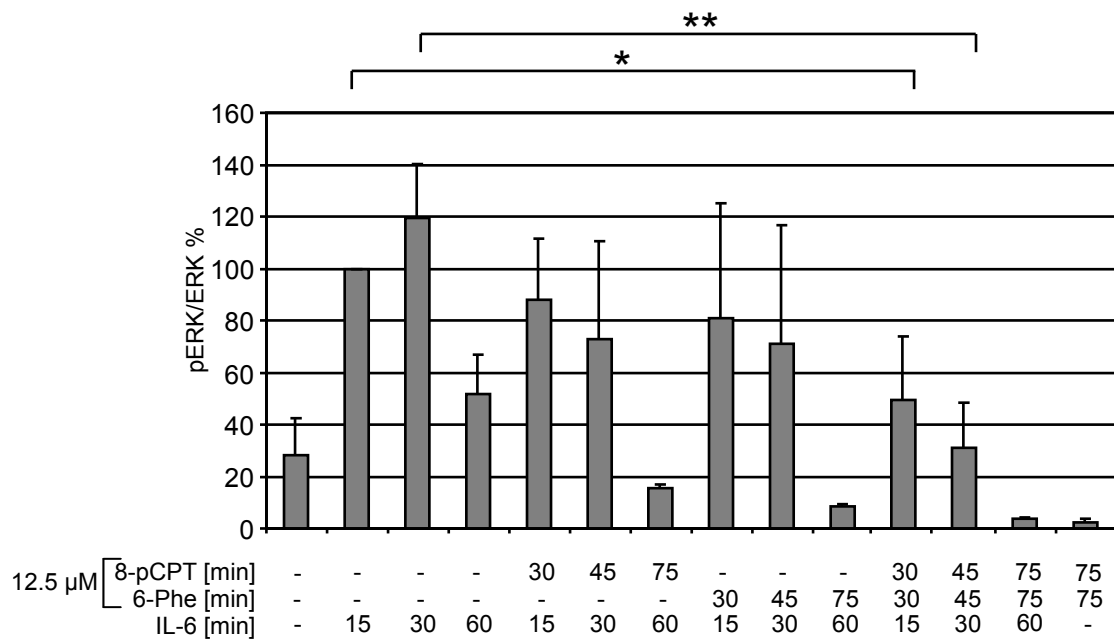
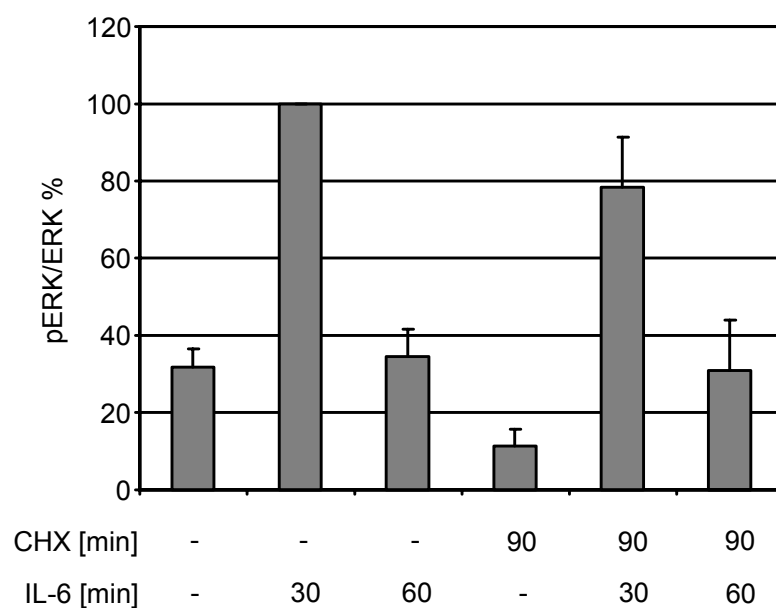


Abb. S2: Densitometrische Analyse der IL-6-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung (vgl. Abb. 25A)

Die densitometrische Analyse des Western Blots wurde wie unter Material und Methoden angegeben durchgeführt. Die Abbildungen zeigt den Mittelwert aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die Phosphorylierung von ERK nach 15 Minuten IL-6-Stimulation wurde auf 100 % gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten student's t -test: $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$.

S3A



S3B

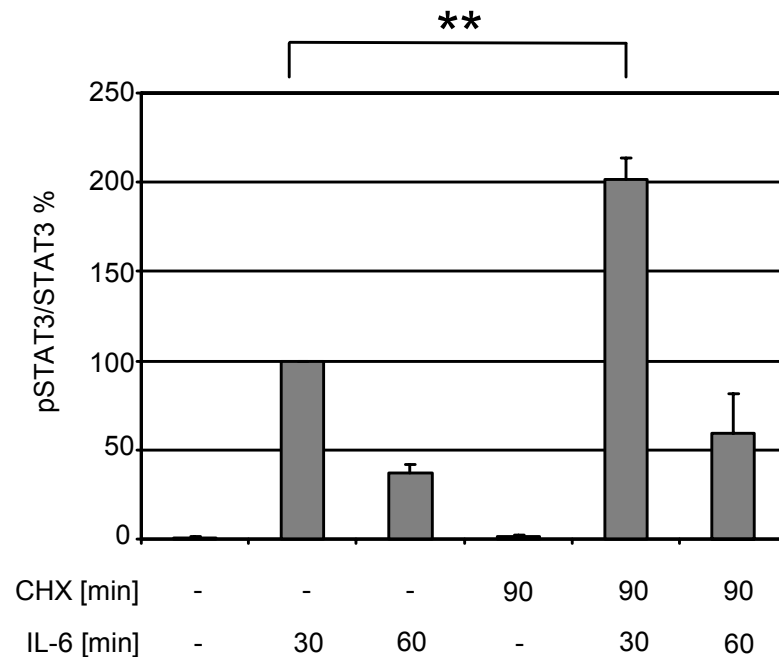
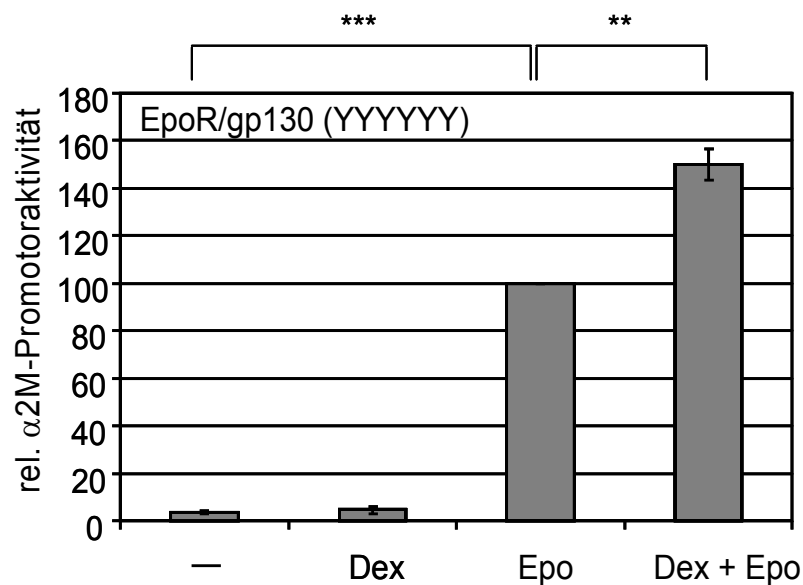


Abb. S3: Densitometrische Analyse der IL-6-induzierten ERK1/2- und STAT3-Phosphorylierung (vgl. Abb. 28C)

Die densitometrische Analyse des Western Blots wurde wie unter Material und Methoden angegeben durchgeführt. Die Abbildungen zeigt den Mittelwert aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die Phosphorylierung von (A) ERK und (B) STAT3 nach 30 Minuten IL-6-Stimulation wurde auf 100 % gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten student's t-test: $**p \leq 0,01$.

S4A



S4B

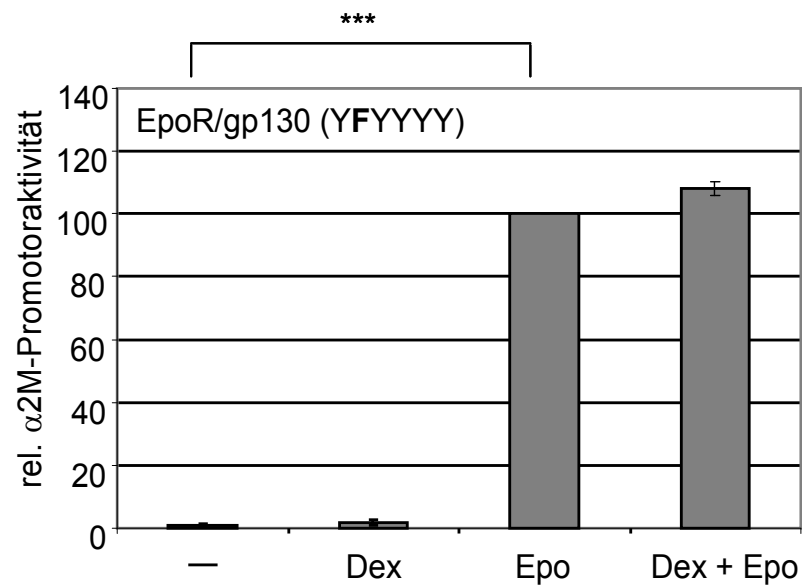


Abb. S4: Reporter-Gen-Analyse zum Einfluss von Dexamethason auf die Induktion des α_2 -Makroglobulin-Promotors

HepG2-Zellen wurden (A) mit dem WT-Rezeptorkonstrukt EpoR/gp130 6Y oder (B) der Rezeptor-mutante EpoR/gp130 YF4Y und einem Reporter-konstrukt für den α_2 M-Promotor transient transfiziert. Die Zellen wurden über Nacht in FKS-freiem Medium kultiviert. Die Stimulation der Zellen erfolgte für 4 Stunden mit Epo (7 U/ml) $\pm$ Dex (1 μ M). Nach Lyse der Zellen erfolgte die Bestimmung der Promotoraktivität wie in Material und Methoden beschrieben. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die Aktivität des Promotors nach Epo-Stimulation bei Expression des WT-Rezeptors wurde auf 100 % gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem gepaarten student's t-test: ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACT	α_1 -Antichymotrypsin
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
α_2 M	α_2 -Makroglobulin
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	<i>activator protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Adenylatzyklase
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
Ca^{2+}	Calcium
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CLC	<i>cardiotrophin-like cytokine</i>
CMV	Cytomegalievirus
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
COX	Cyclooxygenase
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRP	<i>C-reactive protein</i>
Ct	<i>threshold cycle</i>
CT	<i>cardiotrophin</i>
Cul	Cullin
Cy	Carbocyanin
DBD	DNA-Bindedomäne
Dex	Dexamethason
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DUSP	<i>dual specificity phosphatase</i>
EBI	<i>Ebstein-Barr Virus induced gene</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Elk	<i>ETS domain-containing protein Elk</i>

Epac	<i>exchange protein directly activated by cAMP</i>
Epo	Erythropoetin
EpoR/gp130	chimärer Erythropoetin/gp130-Rezeptor
ERK	<i>extracellular regulated kinase</i>
F	Phenylalanin
FGA	Fibrinogen α
FGG	Fibrinogen γ
FKS	Fötales Kälberserum
G	Glucocorticoid
G-6-P	Glucose-6-Phosphatase
Gab	<i>Grb2-associated binder</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GluR	Glucagon-Rezeptor
gp	Glykoprotein
GR	Glucocorticoid Rezeptor
Grb	<i>growth-factor-receptor-bound protein</i>
GRE	<i>glucocorticoid response element</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
H-35	hepatome Leberzelllinie aus der Ratte
HepG2	Humane Hepatomzelllinie aus der Leber
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i>
Hela	Humane Epithelzellen (Gebärmutterhalskrebs)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSP	Hitzeschockprotein
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP	Immunophilin
IP ₃	Inositoltrisphosphat

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRS	<i>insulin receptor substrate</i>
Jak	Janus Kinase
JNK	<i>c-Jun N-terminale kinase</i>
KIR	<i>kinase inhibitory region</i>
LBD	Liganden-Bindedomäne
LIF(R)	<i>leukemia inhibitory factor (receptor)</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK(K)	<i>mitogen activated protein kinase (kinase)</i>
MCF-7	humane Brustkrebszelllinie
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MEK	MAPK/ERK Kinase
miRNA	microRNA
MKP	MAPK-Phosphatase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MUP	<i>major urinary protein</i>
NF	<i>nuclear factor</i>
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
NP	Neuropoetin
Oct	<i>octamer-binding protein</i>
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
OSM(R)	Onkostatin M (Rezeptor)
(p)	Phospho
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PE	Phycoerythrin
PIAS	<i>protein inhibitors of activated STAT</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKCam	Calmodulin-abhängige Proteinkinasen
PLC	Phospholipase C
PTP	<i>protein tyrosine phosphatase</i>

PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	<i>Ras associated factor</i>
RalGDS	<i>Ral guanine nucleotide dissociation stimulator</i>
Rap	<i>RAS-related protein</i>
Ras	<i>retrovirus associated sequence</i>
RBD	<i>Rap-binding domain</i>
Rbx	<i>RING box protein</i>
RMA	<i>Robust Multi-array Average</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT-qPCR	<i>Real-Time-quantitative-PCR</i>
s.	siehe
S	Serin
SAA	<i>serum amyloid A</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SH	<i>src homology domain</i>
SHP	<i>SH2-domain-containing phosphatase</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
T	Threonin
Tab	Tabelle
TAD	Transaktivierungsdomäne
TC	<i>T-cell</i>
Tet	Tetracyclin
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Tf	<i>tissue factor</i>
TF	Transkriptionsfaktor
Tfpi	<i>tissue factor pathway inhibitor</i>
UDG	Uracil-DNA Glycosylase
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WSX	<i>WSXWS type I cytokine</i>

WT	Wildtyp
Y	Tyrosin
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

Mein besonderer Dank gilt...

...Herrn Prof. Fred Schaper für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine persönliche Betreuung auch über die Ferne hinweg.

...Herrn Prof. Bernhard Lüscher, Herrn Prof. Gerhard Müller-Newen, Herrn Dr. Jörg Hartkamp und Herrn Dr. Ferdinand Kappes für die Gewährung von Labor-Asyl.

...Herrn Prof. Werner Baumgartner für die Übernahme des Zweitgutachtens.

...Herrn Prof. Christian Trautwein, Dr. Sara Dutton-Sackett, Sibille Sauer-Lehnen, Carmen G. Tag und Dr. Bernd Denecke für die unkomplizierte Bereitschaft zur Kooperation.

...Anna Dittrich für die gute Zusammenarbeit und das Teilen von Erfolg und Leid.

...dem restlichen Team von Labor 15: René Eulenfeld, Janka Günther, Pia Müller, Barbara Mütze, Dieter Schwache und Alexandra Wolf für fachlichen Rat und aufmunternde Gespräche.

...Anne Mohr als Mitstreiterin und Freundin seit Beginn des Studiums.

...allen Mitarbeitern der Etage 3, Flur 42 für das angenehme Arbeitsklima.

...meiner Familie und meinem Freund für die stetige Unterstützung auf meinem Lebensweg.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Khoury
Vorname:	Christina
Geburtsdatum:	18.02.1983
Geburtsort:	Erlangen
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Ausbildung

10/2008 – 02/2012	Promotion im Fachbereich Biologie am Instiut für Biochemie und Molekularbiologie der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen University
04/2005 – 10/2008	Wirtschaftswissenschaftliches Zusatzstudium an der RWTH Aachen University (MBA)
09/2002 – 06/2008	Studium der Biologie an der RWTH Aachen University (Dipl.-Biol.)
08/1993 – 06/2002	Gymnasium Moltkestraße Gummersbach (Allgemeine Hochschulreife)