

**Aus der  
Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie  
Der Heinrich-Heine Universität**

**Direktor: Professor Dr. Dieter Häussinger**

**Bedeutung der Tyrosinphosphatase SHP-2 sowie der  
p38<sup>MAPK</sup> für die Modulation der IL-6 Signalvermittlung  
durch TNF $\alpha$**

---

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität  
Düsseldorf**

**vorgelegt von**

**Jan Kehrmann**

**2007**

„Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“  
gez: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg  
Dekan  
Referent: PD Dr. med. Johannes Bode  
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Schulze-Osthoff

*Gewidmet  
meinen Eltern  
in Liebe und Dankbarkeit*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><i>Einleitung</i></b>	<b>1</b>
1.1	Allgemeine Einführung und Ausgangssituation	1
1.2	Funktionen des Zytokins IL-6	2
1.3	Signalkaskade des IL-6-Signalweges	4
1.4	Funktionen des Zytokins TNF $\alpha$	7
1.5	Die Signalkaskade von TNF $\alpha$	8
1.6	Bedeutung von TNF $\alpha$ im Rahmen der Sepsis	10
1.7	Bedeutung von TNF $\alpha$ bei der Rheumatoiden Arthritis sowie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Therapiemöglichkeiten über die Beeinflussung der TNF $\alpha$ -Signalvermittlung	13
1.8	Modulation der IL-6-induzierten Signalübertragung: Zytokin-„Crosstalk“ von IL-6 und TNF $\alpha$	14
<b>2</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b>	<b>17</b>
2.1	<b>Material</b>	<b>17</b>
2.1.1	Antikörper	17
2.1.2	Lösungen und Puffer	17
2.1.3	Agarose-sealing-solution	20
2.1.4	Western-Blot-Puffer	20
2.1.5	Zelllinien	21
2.1.6	EMSA-Sonden	22
2.1.7	Plasmide	22
2.1.8	Restriktionsenzyme	23
2.1.9	Nukleinsäureaufreinigung	23
2.1.10	PCR und Klonierung	24
2.1.11	Proteinaufreinigung, Immunpräzipitation und Western Blot	24
2.1.12	Zellkultur und Transfektion	24
2.1.13	Zytokine	25
2.1.14	Medien	25
2.1.15	Antibiotika	25
2.2	<b>Methoden</b>	<b>26</b>
2.2.1	Transfektion von Zellen für Reporter-Gen-Assays	26
2.2.2	Transfektion für Zelllysate	26
2.2.3	Transfektion für die Fixierung von Zellen auf Objektträgern für das konfokale LSM	27
2.2.4	Herstellung von Zelllysaten (für Western Blot)	27
2.2.5	Herstellung von Kernextrakten	27
2.2.6	Electrophoretic mobility shift essay (EMSA)	28
2.2.7	Ko-Immunpräzipitation (Auftrennung von Zelllysaten über die SDS-Gelelektrophorese )	28
2.2.8	Ko-Immunpräzipitation (Auftrennung von Zelllysaten über die zweidimensionale Elektrophorese)	29

2.2.9	Zweidimensionale Elektrophorese mit immobilisiertem pH-Gradienten	29
2.2.10	Silberfärbung	30
2.2.11	Western Blot	30
2.2.12	Transformation von Bakterien	30
2.2.13	Agarosegelelektrophorese	31
2.2.14	Luciferase Assay	31
2.2.15	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.2.16	Ligation	32
<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b>	<b>33</b>
3.1	<b>Einfluss von <math>\text{TNF}\alpha</math> auf die Tyrosinphosphorylierung von STAT3</b>	<b>33</b>
3.2	<b>Beteiligung der <math>\text{p38}^{\text{MAPK}}</math> und des Tyrosinmotivs 759 des gp130-Moleküls an der Hemmung des IL-6-Signalweges durch <math>\text{TNF}\alpha</math></b>	<b>35</b>
3.3	<b>Beeinflussung der durch <math>\text{TNF}\alpha</math> vermittelten Rekrutierung der SHP2 an gp130 durch Hemmung der <math>\text{p38}^{\text{MAPK}}</math> oder Protein-Tyrosin-Kinasen</b>	<b>37</b>
3.4	<b>Einfluss der SHP2 auf die IL-6 induzierte STAT3-Aktivierung</b>	<b>39</b>
3.5	<b>Rolle der SHP2 bei der Hemmung der IL-6-Signalvermittlung durch <math>\text{TNF}\alpha</math></b>	<b>40</b>
3.6	<b>Einfluss von <math>\text{TNF}\alpha</math> auf die durch IL-6 hervorgerufene Phosphorylierung der <math>\text{ERK}^{\text{MAPK}}</math></b>	<b>43</b>
3.7	<b>Beeinflussung der STAT3-Serinphosphorylierung durch IL-6 und Einfluss von <math>\text{TNF}\alpha</math> auf diese Phosphorylierung</b>	<b>45</b>
3.8	<b>Generierung von <math>\text{p38}^{\text{MAPK}}</math>-Fusionsproteinen</b>	<b>49</b>
3.8.1	$\text{p38}^{\text{MAPK}}$ -YFP	50
3.8.2	$\text{p38}$ -pGEX ( $\text{p38}$ -GST-Konstrukt)	53
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b><i>Ausblick</i></b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b><i>Danksagung</i></b>	<b>71</b>
<b>9</b>	<b><i>Lebenslauf</i></b>	<b>73</b>

---

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Allgemeine Einführung und Ausgangssituation

Die Molekulare Biotechnologie hat in den letzten Jahren einen Wandel von den Genomics zu den Proteomics vollzogen. Seit Ende der 90er Jahre sind mit der Entschlüsselung mehrerer Genome, unter anderem des menschlichen, wichtige Fortschritte erzielt worden. Heute steht die Erforschung der Funktionen der eigentlichen Effektormoleküle, der etwa 500.000 verschiedenen Proteine, die von ca. 30.000 Genen kodiert werden, im Vordergrund. Das Verstehen der Abläufe innerhalb und außerhalb der Zellen, die durch diese Moleküle hervorgerufen werden, ist grundlegend für das Verständnis der Entstehung vieler Krankheiten und damit Voraussetzung, um in weiteren Schritten neue Therapieansätze zu entwickeln.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den molekularen Mechanismen der Beeinflussung des IL-6-Signalweges durch TNF- $\alpha$ . IL-6 und TNF $\alpha$  sind Zytokine, die sowohl bei akuten als auch chronischen Entzündungsprozessen eine große Rolle spielen.

Ausgangspunkt waren die in der Arbeitsgruppe gewonnenen Erkenntnisse, dass TNF $\alpha$  zu einer Expression von SOCS3 und einer Hemmung der durch IL-6 induzierten STAT3-Aktivierung führt [1]. Inhibitorstudien legten nahe, dass sowohl die Induktion von SOCS3 als auch die durch IL-6-induzierte Hemmung der STAT3-Aktivierung von der Aktivität der p38<sup>MAPK</sup> abhängig sind. Weiterführende Untersuchungen, die unter anderem von Schweigart in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, konnten zeigen, dass die Stimulation von Makrophagen mit TNF $\alpha$  zu einer Tyrosinphosphorylierung der Tyrosinphosphatase SHP2 sowie von gp130, und zu einer Assoziation beider Proteine führt [2].

Vor diesem Hintergrund stellten sich folgende interessante Fragestellungen, deren Beantwortung Anlass der vorliegenden Untersuchungen waren:

- 1 Bedeutung der Tyrosinphosphatase SHP2 für den inhibitorischen Einfluss von TNF $\alpha$  auf die IL-6-Signalvermittlung
- 2 Weitere Abklärung der durch Inhibitorstudien suggerierten Rolle der p38<sup>MAPK</sup> für die Hemmung der durch IL-6 induzierten STAT-Aktivierung durch TNF $\alpha$
- 3 TNF $\alpha$ -abhängige Modulation der differentiellen Aktivierung von STAT3 und ERK<sup>MAPK</sup> durch IL-6

## 1.2 Funktionen des Zytokins IL-6

IL-6 ist ein multifunktionales Zytokin mit einem Gewicht um 20 kDa. Es spielt in der Regulation physiologischer und pathophysiologischer Prozesse wie der Hämatopoese, der Aktivierung und Differenzierung von Lymphozyten und der Kontrolle der Synthese von Akut-Phase Proteinen eine wesentliche Rolle. Es reguliert sowohl die Expression von immunologischen und inflammatorischen Genen, als auch Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zellen. Da die Serumkonzentration bei entzündlichen Erkrankungen erhöht ist und IL-6 durch Entzündungsprozesse induziert wird, wurde es bisher überwiegend als proinflammatorisches Zytokin diskutiert [3-8]. Die proinflammatorischen Eigenschaften werden beispielsweise ausgelöst durch die durch IL-6 hervorgerufene Antikörperproduktion in B-Lymphozyten, die aktivierende Wirkung auf T-Lymphozyten und die verstärkte Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen durch Endothelzellen [3, 5, 8].

Auf der anderen Seite werden auch eine Reihe von entzündungshemmenden Vorgängen durch IL-6 vermittelt. Während die proinflammatorischen Prozesse vor allem durch Lymphozyten und Endothelzellen hervorgerufen werden, hat IL-6 auf eine Reihe anderer Zelltypen, vor allem Makrophagen [6, 9-12] und Fibroblasten [13], sowie auf Astrozyten [14], eine entzündungshemmende Wirkung. IL-6 führt dort zur Induktion von entzündungshemmenden Zytokinen wie IL-10 und induziert die Synthese von beispielsweise Proteinaseinhibitoren. Darüber hinaus senkt es die Produktion entzündungsfördernder Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$ , IL-12,  $\text{IFN-}\gamma$  und IL-1 $\beta$  [10-12], die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Induktion von Protease-Inhibitoren [14, 15]. Ferner induziert IL-6 die Freisetzung des IL-1 $\beta$ -Rezeptorantagonisten und des löslichen  $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptors p55, worüber es die Wirkung von IL-1 $\beta$  und  $\text{TNF}\alpha$  antagonisiert [16, 17]. Zusätzlich führt IL-6 über die Freisetzung von CRH (corticotropin-releasing hormone) durch Zellen des Hypothalamus zur indirekten Erhöhung der ACTH-Konzentration, sowie durch direkte Wirkung auf die Zellen des Hypophysenvorderlappens zum weiteren Anstieg von ACTH im Blut. ACTH induziert seinerseits die Glucocorticoidsynthese in der Nebennierenrinde, wobei diese durch ihre entzündungshemmenden Eigenschaften modulierend in das Entzündungsgeschehen eingreifen [4-6, 18, 19].

IL-6 besitzt demnach sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften.

IL-6 wird während aller Entzündungsstadien exprimiert [6, 20]. Zumindest zu Beginn einer Entzündungsreaktion wären die antiinflammatorischen Eigenschaften unerwünscht. Es ist daher anzunehmen, dass Mechanismen existieren, durch die die Zellen in der Lage sind, das IL-6-Signal angemessen zu verarbeiten. So wirkt IL-6 in Mäusen, bei denen SOCS3 in

Makrophagen nicht exprimiert wird, als ein antiinflammatorisches Zytokin mit ähnlichen Eigenschaften wie IL-10, das zur Aktivierung von STAT3, aber auch zur Hemmung von Makrophagen führt [21]. So wird die Wirkung von IL-6 und möglicherweise auch von anderen Zytokinen je nach Ausmass und Zeitpunkt der Expression von regulatorischen Proteinen, die in die Signaltransduktion eingreifen, in die proinflammatorische oder antiinflammatorische Richtung gelenkt. Eine gestörte Expression dieser regulatorischen Proteine könnte in diesem Kontext die Chronifizierung von Entzündungsreaktionen begünstigen.

Krankheiten können auch bei einem Ungleichgewicht der unterschiedlichen Signalwege, die durch ein Zytokin induziert werden, entstehen. Für IL-6 hat Ernst et al. in Tierversuchen mit Mäusen zeigen können, dass Mäuse, bei denen die Bindungsdomäne für STAT am gp130-Rezeptor mutiert ist, unter degenerativen Gelenkerkrankungen und gastrointestinalen Ulcera leiden [22]. In diesen Tieren wird der STAT-Signalweg nicht mehr aktiviert, dafür verläuft die Aktivierung der ERK<sup>MAPK</sup> über die SHP2 verstärkt und verlängert ab. Bei dem entgegengesetzten Extrem, bei dem es durch Mutation der SHP2-Bindungsstelle von gp130 nicht mehr zur Bindung der SHP2 an gp130 und dadurch zur Aktivierung der ERK<sup>MAPK</sup> durch IL-6 kommen kann, entwickeln die Tiere Carcinome des Magens. In diesen Tieren verläuft der STAT-Signalweg verstärkt ab [23]. In früheren Arbeiten war bereits gezeigt worden, dass die konstitutive Aktivierung von STAT3 in mehreren Gewebetypen oncogen wirkt und dass die vorwiegende Aktivierung der durch die SHP2 induzierten Signalwege wichtig bei der Regulierung des Mucosawachstums und der Expression von Tumorsuppressorgenen ist.

Der IL-6-Signalweg besitzt eine protektive Funktion bei chronischen Lebererkrankungen. Streetz et al. konnten durch Experimente mit Mäusen, denen der IL-6-Rezeptor gp130 selektiv in Hepatozyten und anderen nicht-parenchymalen Leberzellen fehlt, zeigen, dass es nach Schädigung der Leber durch CCl<sub>4</sub> zu einem makroskopisch wie mikroskopisch sichtbaren Fortschreiten der Fibrose im Vergleich zu Wildtyp-Tieren kommt, während bei akuten Leberschädigungen keine quantitativen Differenzen im Ausmaß der Schädigung zu erkennen waren [24]. Die Fibroseprogression war nur bei Mäusen zu finden, bei denen sowohl in Hepatozyten als auch in nicht-parenchymalen Zellen das gp130-Molekül fehlte. Tiere, bei denen nur Hepatozyten vom Fehlen des gp130-Moleküls betroffen waren, zeigten ebenso geringe Schädigungen wie die Wildtyp-Tiere [24]. Daraus lässt sich ableiten, dass Hepatozyten keinen Einfluss auf das Fortschreiten einer Fibrose haben, sondern andere Zellen dafür verantwortlich sind. Wahrscheinlich ist das gp130-Signal in nicht-parenchymalen Leberzellen, aber auch von immunaktivierten Zellen, die die Leber infiltrieren, für einen Schutz der Leber vor Fibrose verantwortlich.



Ein Ziel für die Zukunft wird sein, den genauen Zelltyp ausfindig zu machen, um den gp130-abhängigen schützenden Einfluss auf die Progression der Fibrose im Rahmen chronischer Lebererkrankungen durch eine molekulare Therapie zu verstärken.

### 1.3 Signalkaskade des IL-6-Signalweges

Die IL-6-Signalübertragung verläuft über einen spezifischen Rezeptorkomplex, der zur Klasse I-Familie gehört. Nach neuem Kenntnisstand entsteht in der Gegenwart von IL-6 ein hexamerer Rezeptorkomplex, der durch Bindung von zwei Molekülen IL-6 an ihre spezifische  $\alpha$ -Rezeptoruntereinheit gp80 und Rekrutierung zweier signaltransduzierender Rezeptoruntereinheiten gp130 entsteht [5, 25]. In der Folge kommt es zu einer Auto-Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von Tyrosinkinase der Janus-Familie Jak1, Jak2 und Tyk2, die konstitutiv an gp130 assoziiert sind [26, 27]. Hierbei ist, soweit aus Experimenten mit Jak-1 defizienten Zellen gefolgert werden kann, Jak-1 für die Signalvermittlung von IL-6 von zentraler Bedeutung. Die Auto-Phosphorylierung der Janus-Kinasen wird durch die räumliche Annäherung der Tyrosinkinase im Rahmen der Dimerisierung erklärt. In der Folge kommt es zur Tyrosinphosphorylierung des zytoplasmatischen Teils von gp130, eine Voraussetzung für die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren der Familie „Signal Transducers and Activators of Transcription“ (STAT) an gp130 [5, 28, 29]. Im Falle der IL-6-Signalvermittlung ist hierbei vor allem STAT3 relevant, während STAT1 und STAT5 eine eher untergeordnete Bedeutung zukommt. Ausserdem werden STAT-Faktoren jeweils an einem einzelnen c-terminalen Tyrosin-Rest phosphoryliert. Dies ist wiederum Voraussetzung für die Ausbildung von aktivierten STAT3-Homodimeren oder STAT1/3-heterodimeren Komplexen, die ihrerseits in den Kern translozieren, um dort an STAT-responsive Elemente in den Promotorregionen entsprechender Zielgene zu binden. Hierbei unterliegen die Gene vieler an der Akut-Phase Reaktion beteiligter Proteine der transkriptionellen Kontrolle durch STAT-Faktoren. Hierzu gehören unter anderem auch Akut-Phase Proteine wie das C-reaktive Protein, Fibrinogen oder  $\alpha_2$ -Makroglobulin. In der Regulation dieser Gene spielen neben STAT-Faktoren jedoch auch weitere Transkriptionsfaktoren wie z.B. C/EBP $\delta$ /NF-IL-6, NF- $\kappa$ B oder AP-1 eine Rolle, die in diesem Zusammenhang oft in Verbindung mit STAT3 agieren. [5, 25].

Auf der anderen Seite führt IL-6 zu einer Rekrutierung der SHP2 an die Rezeptoruntereinheit gp130. Dabei interagiert die SHP2 über eine spezifische Phosphotyrosin-SH2-Domäne mit dem Tyrosin 759 des gp130-Moleküls [30, 31]. Es ist die gleiche Stelle, an die auch SOCS3 bindet. Sowohl SOCS3, als auch die SHP2 sind in der Lage, die durch IL-6 induzierte JAK-STAT-Signalvermittlung zu hemmen [29, 32-34]. Welche spezifische Rolle dem jeweiligen Molekül bei einer Hemmung der Signalvermittlung zukommt, ist jedoch noch unklar. SHP2

hemmt einerseits die Aktivierung von STAT-Faktoren durch IL-6. Andererseits dient es als Adapterprotein, über welches gp130 auch die MAP-Kinasen-Kaskade zu aktivieren vermag.

Demnach kommt es durch IL-6 zu einer Aktivierung mehrerer parallel verlaufender Signalwege. Obwohl alle Zellen gp130-Moleküle exprimieren, reagieren sie nicht alle auf eine Stimulation mit IL-6, da die Expression des zytokinbindenden gp80-Moleküls streng reguliert wird und es nicht von allen Zellen exprimiert wird [5, 25]. Andere IL-6-Typ-Zytokine wie IL-11, Leucaemia inhibitory factor (LIF), Cardiotropin-1 (CT-1), ciliary neurotropic factor (CNTF), oncostatin M (OSM) signalisieren sehr wohl jedoch noch gp130-abhängig über die Bindung an ihre spezifische Rezeptoruntereinheit unter Ausbildung des jeweils spezifischen Rezeptorkomplexes, an dem gp130 dann beteiligt ist [5].

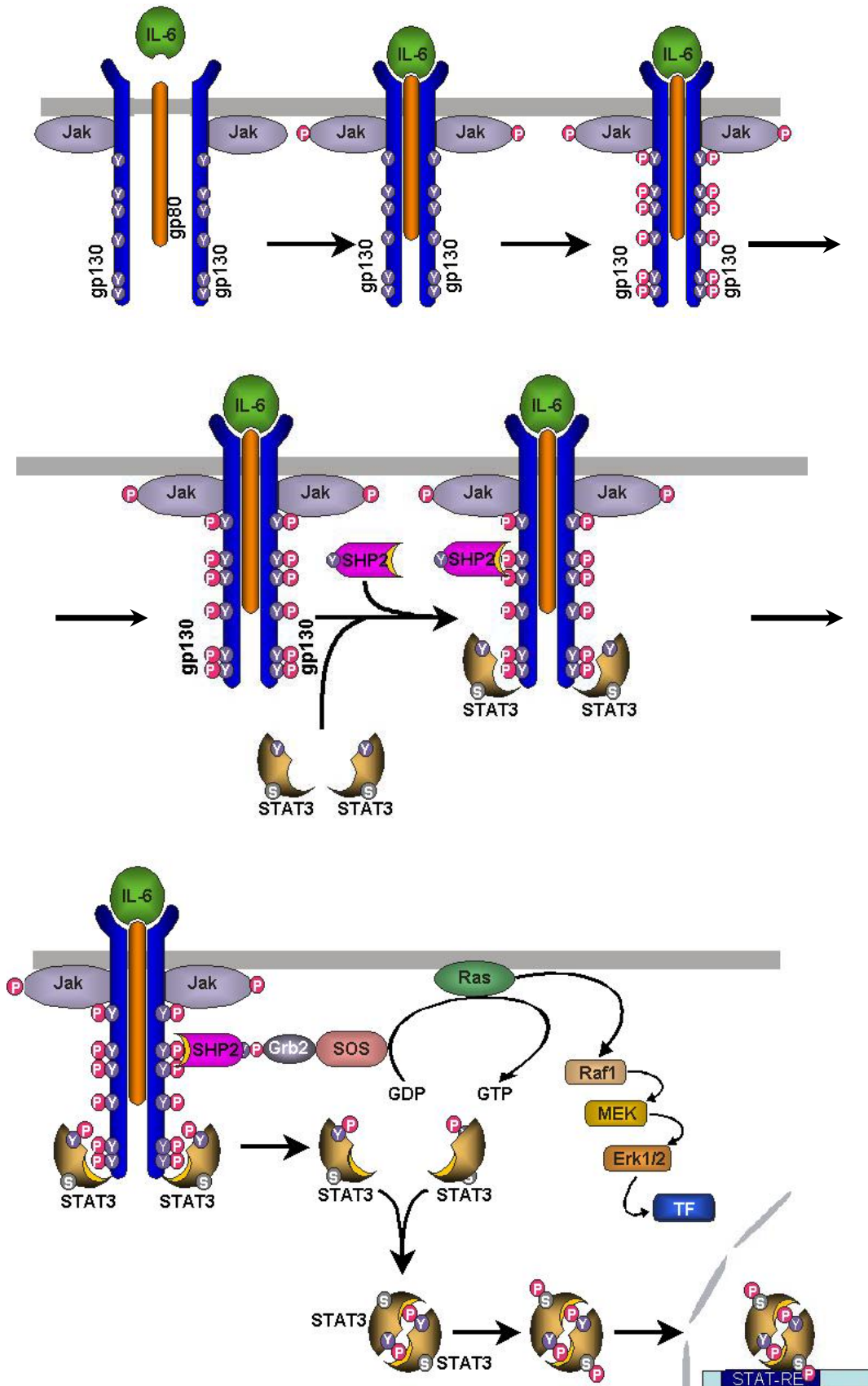


Abbildung 1: Schematische Darstellung der IL-6-abhängigen Signaltransduktion über den gp130/Jak/STAT Signalweg (modifiziert nach Häussinger et al.[35])

## 1.4 Funktionen des Zytokins TNF $\alpha$

TNF  $\alpha$  ist an der Vermittlung einer Vielzahl verschiedener zellulärer Antworten beteiligt. Es ist ein wichtiger Mediator der nichtadaptiven Immunantwort und spielt weiterhin eine herausragende Rolle im Verlauf mehrerer entzündlicher Erkrankungen, unter anderem bei der Sepsis und der rheumatoiden Arthritis [36, 37]. Es gibt zahlreiche Studien, in denen versucht wurde, über die Blockierung des TNF $\alpha$ -Signalweges eine Besserung des Krankheitsverlaufes oder gar eine Heilung zu erreichen. Hierbei legen - wie weiter unten näher ausgeführt - insbesondere die Erfolge in der Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen aus dem Kreis der chronisch entzündlichen Gelenkerkrankungen, aber auch der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [38, 39], eine pathogenetische Relevanz von TNF $\alpha$  nahe, ein Aspekt, der vor allem auch hinsichtlich der chronisch entzündlichen Gelenkerkrankungen durch Untersuchungen an für TNF $\alpha$  transgenen Tieren unterstützt wird [39]. Ursprünglich entdeckt wurde TNF $\alpha$  als Faktor, der, durch bakterielle Lipopolysaccharide induziert, in der Lage war, den Rückgang und Zelltod einiger Tumoren zu bewirken [40]. Unabhängig davon wurde es als Mediator der Kachexie im Rahmen von chronischen Infektionen und Tumoren identifiziert und dann initial auch als Kachexin bezeichnet [41, 42]. Heute ist bekannt, dass TNF $\alpha$  an einer Vielzahl biologischer Effekte beteiligt ist. Obwohl vor allem aktivierte Makrophagen und Monozyten für die Produktion von TNF $\alpha$  verantwortlich sind [43], können auch verschiedene andere Zellen dieses Molekül synthetisieren. Dazu gehören Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, Keratinozyten, Mastzellen und einige Tumorarten [44].

TNF $\alpha$  wird zunächst als transmembranöses 233-aminosäurehaltiges Prozytokin synthetisiert [45], von dem ein 76-aminosäurehaltiges Signalpeptid durch membranständige Metalloproteasen der ADAM (a desintegrin and metalloproteinase-Familie) proteolytisch abgespalten wird, um das fertige 17 kd schwere TNF $\alpha$ -Molekül zu erhalten [46].

Im Menschen ruft TNF $\alpha$  eine Fülle inflammatorischer und kataboler Effekte hervor. Dazu gehören unter anderem Fieber, Schock, Kachexie, Gewebeschäden, Anämie und die Induktion von Akut-Phase Proteinen der Leber [47-49]. Die biologischen Wirkungen werden zum einen durch direkten Einfluss auf die Zielgewebe und -zellen hervorgerufen, zum anderen durch die Induktion anderer Zytokine wie IL-1, IL-6 und IL-8 [44, 50, 51]. Die durch TNF $\alpha$  hervorgerufene Einwanderung von Leukozyten in Entzündungsgebiete basiert auf der Induktion von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und der Angiogenese [52-54]. Ausserdem potenziert TNF $\alpha$  die Aktivität von Lymphozyten [44, 55]. Die genannten Eigenschaften zeigen die Bedeutung dieses Zytokins bei der Abwehr einer Vielzahl von Pathogenen, vor allem intrazellulärer Bakterien und Parasiten, sowie möglicherweise einiger Viren.

## 1.5 Die Signalkaskade von $\text{TNF}\alpha$

Die biologische Wirkung von  $\text{TNF}\alpha$  wird über 2 unterschiedliche Rezeptoren vermittelt, über den TNF-Rezeptor (TNFR) 1 mit einem Molekulargewicht von 55-60 kDa und den TNFR 2, dessen Molekulargewicht 75-80 kDa beträgt. Dabei werden auf vielen Zelltypen beide Rezeptoren gleichzeitig exprimiert, wobei jedoch die Mehrzahl der biologischen Antworten über den TNFR1 vermittelt wird, für den  $\text{TNF}\alpha$  eine vielfach höhere Affinität besitzt als für den TNFR2. Einige zelluläre Antworten können jedoch durch den TNFR2 allein ausgelöst werden, so die Induktion der Thymozyten- und T-Zellproliferation [56], die Produktion von GM-CSF [57], die Aktivierung von NF- $\kappa$ B [58], sowie in manchen Systemen auch die Induktion von Apoptose [59].

Die intrazelluläre Signaltransduktion über TNFR1 ist ausserordentlich komplex und noch lange nicht vollständig erforscht und verstanden. Sie kann zu vielfältigen, auch gegensätzlichen Zellantworten führen, zu denen Zellproliferation, Entzündung und Zelltod zählen. Normalerweise sind die apoptotischen Signalwege unterlegen, so dass die meisten Zellen eine gewisse Resistenz gegenüber der Toxizität durch  $\text{TNF}\alpha$  aufweisen. Die Zellen können aber durch eine Blockierung der Protein- oder RNA-Synthese gegenüber apoptotischen Signalwegen sensitiviert werden, so dass davon auszugehen ist, dass die Proteinsynthese benötigt wird, um apoptotische Stimuli zu unterdrücken.

Die Signaltransduktion wird durch Bindung des trimeren  $\text{TNF}\alpha$ -Moleküls an TNFR1 oder TNFR2, beides Typ-I-Transmembranrezeptoren initiiert. Durch die Bindung kommt es zu einer Trimerisierung der TNF-Rezeptoren. Während es beim TNFR2 direkt zu einer Assoziation von TRAF 2 (TNFR Associated Factor 2) an den Rezeptor kommt, bildet sich beim TNFR1 zunächst ein Komplex aus Rezeptor und TRADD (TNFR1 Associated Death Domain Protein), wobei TRADD als ein Adapterprotein fungiert, das mindestens drei weitere Moleküle, TRAF2, RIP 1 (Receptor Interacting Protein) und FADD (Fas-Associated Death Domain) rekrutiert [60-62]. Die Signalwege, die über TRAF2 vermittelt werden, finden bei beiden TNF-Rezeptoren statt, während die Signaltransduktion über FADD nur am TNFR1 ablaufen kann [63].

Für die vielfältigen unterschiedlichen  $\text{TNF}\alpha$ -Antworten über den TNFR1 sind mehrere Signalwege verantwortlich, die im folgenden diskutiert werden:

- 1) FADD vermittelt apoptotische Signalwege über die Aktivierung der Caspase 8, einer Cystein-Protease [64].

2) Über TRAF2 verlaufen mindestens zwei unterschiedliche Signalwege [65]:

- a) RIP bindet nach Rezeptorstimulation über seine Death-Domain an TRADD und über seine intermediäre Region an TRAF2 und führt zur Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase NIK (NF- $\kappa$ B inducing kinase) [60, 61]. Die Aktivierung der NIK findet jedoch über TRAF2 auch in Abwesenheit von RIP statt. NIK bindet die I $\kappa$ B-Kinasen IKK- $\alpha$  und IKK- $\beta$ , die Bestandteile des IKK-Komplexes sind, der aus den drei Bestandteilen IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  sowie IKK- $\gamma$ , auch NF $\kappa$ B essential modulator (NEMO) genannt, zusammengesetzt ist [66, 67]. Der Schlüssel zur NF $\kappa$ B-Aktivierung ist die durch den aktivierten IKK-Komplex hervorgerufene Serinphosphorylierung von I $\kappa$ B- $\alpha$ , das auch als NF $\kappa$ B-Inhibitorprotein bezeichnet wird. Die Aktivierung führt zur Degradation des Inhibitorproteins I $\kappa$ B- $\alpha$  [68]. Das vermehrt freigesetzte NF- $\kappa$ B, ein Heterodimer, bestehend aus vorwiegend p50/p65-Heterodimeren, kann nachfolgend über seine nukleäre Lokalisationssequenz in den Zellkern translozieren und an die DNA binden [69, 70]. Zum effizienten Transkriptionsstart muss die p65 Untereinheit jedoch phosphoryliert werden [71].
  
- b) Ausserdem werden zwei MAP-Kinasen über TRAF2 aktiviert, die c-jun N-terminale Kinase (JNK<sup>MAPK</sup>) und die p38<sup>MAPK</sup>, wobei die p38<sup>MAPK</sup> für die vorliegende Arbeit eine wesentliche Bedeutung besitzt. Die Aktivierung beider MAP-Kinasen läuft unter anderem über die Phosphorylierung der MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) ASK1, die auch an TRAF2 bindet [72].
  - Die p38<sup>MAPK</sup> wird über die Phosphorylierung der MKK3 und MKK6 aktiviert, welche wiederum zuvor unter anderem über Tyrosinphosphorylierung durch die MAPKKK ASK1 aktiviert werden kann. Die Aktivierung der p38<sup>MAPK</sup> ist essentiell für die Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise ATF-1, ATF-2, CHOP oder Max, für die Produktion proinflammatorischer Zytokine, z.B. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 und für die Expression proinflammatorischer Enzyme wie COX-2 und iNOS. (AP-1) [73].
  - Die Funktion der Aktivierung der c-jun-NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase (JNK<sup>MAPK</sup>) in der TNF $\alpha$ -Signalvermittlung ist heute noch sehr umstritten und reicht von protektiv über belanglos bis zu pro-apoptisch, was vor allem auch vom Zelltyp abhängig ist [74]. Jedenfalls scheint die JNK<sup>MAPK</sup>-Aktivierung zur TNF $\alpha$ -induzierten Apoptose in Hepatozyten beizutragen [75]. Die JNK<sup>MAPK</sup> wird über eine MAP-Kinasen-Kaskade, bestehend aus den JNK<sup>MAPK</sup>-Kinasen (JNKK1/MKK4/SEK1) und JNKK2/MKK7, sowie verschiedenen MAPKK-Kinasen aktiviert [76].

3)  $\text{TNF}\alpha$  führt wie IL-6 zu einer Aktivierung der  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ , die in der vorliegenden Arbeit von Bedeutung sind. Der Mechanismus der Aktivierung durch  $\text{TNF}\alpha$  ist bis heute noch weitgehend unbekannt. Für die  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ -Aktivierung scheint das Protein MADD (MAP kinase-Activating Death Domain protein), das an den  $\text{TNFR1}$  bindet, eine Rolle zu spielen [77]. In Überexpressionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von MADD zu einer gesteigerten  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ -Aktivierung führt [77].

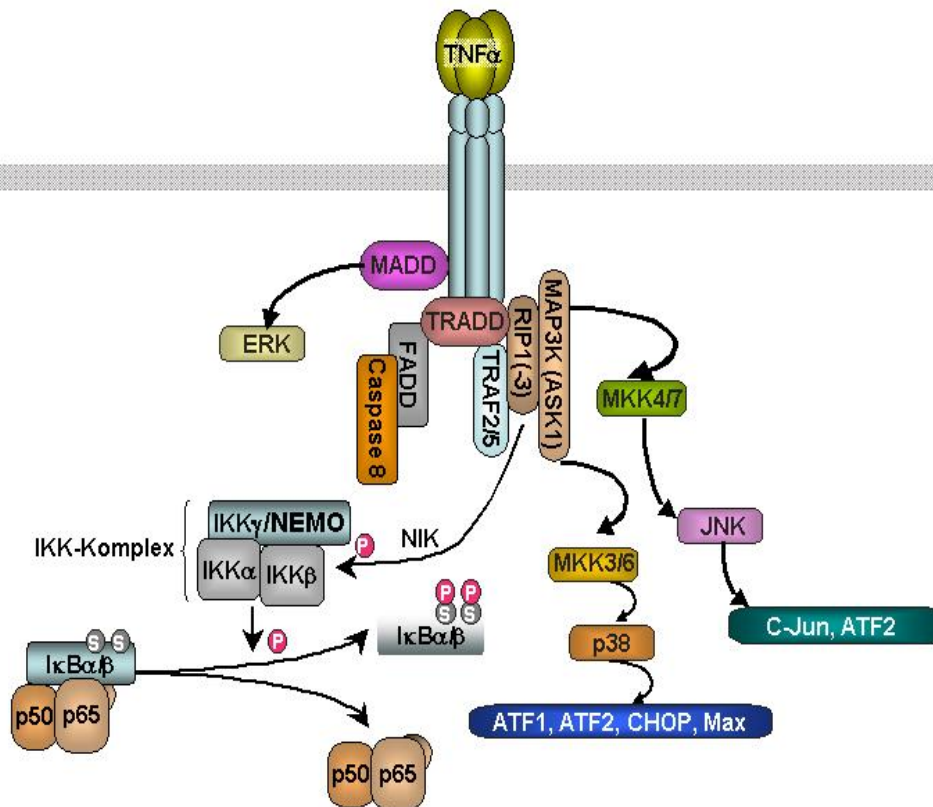


Abbildung 2: Schematische Darstellung der  $\text{TNF}\alpha$ -Signaltransduktion über den  $\text{TNF-R1}$

## 1.6 Bedeutung von $\text{TNF}\alpha$ im Rahmen der Sepsis

$\text{TNF}\alpha$  ist nach heutiger Auffassung eines der bedeutendsten Zytokine bei der Entstehung und im Verlauf der Sepsis [78]. Unter Sepsis versteht man eine Allgemeininfektion mit Krankheitserscheinungen, die durch das Vorhandensein von Bakterien im Blut hervorgerufen wird. Dabei bestimmt vor allen Dingen die immunologische Reaktion des Organismus den klinischen Verlauf der Krankheit. Auch heute besteht eine hohe Morbidität und Mortalität im Rahmen einer Sepsis. Während die Letalität vor 30 Jahren bei über 70 % lag [79], ist sie auch heute noch immer hoch und beträgt etwa 50%, obwohl in der heutigen Zeit potente Antibiotika und eine wesentlich bessere intensivmedizinische Versorgung zur Verfügung stehen [80, 81]. Ausserdem ist die Rate der infektiösen Erkrankungen, bei denen es zu einer Sepsis kommt, in den letzten Jahren kontinuierlich angestiegen. Verantwortlich dafür sind mehrere Faktoren, etwa der verstärkte Einsatz von zytotoxischen und immunsuppressiven Therapien, die verlängerte Lebenserwartung und das damit zunehmende Alter der

Patienten, die erhöhte Rate an resistenten Keimen und der häufigere Einsatz invasiver Maßnahmen, wie beispielsweise Gefäßkatheter [82].

Nachdem erkannt wurde, dass eine überschüssige Immunantwort auf das Eindringen von Mikroorganismen entscheidend bei der Entstehung des SIRS („Systemic Inflammatory Response Syndrome“), der Sepsis und des Multiorganversagens ist und ausserdem in Tierversuchen gezeigt werden konnte, dass vor allen Dingen  $TNF\alpha$  und ein weiteres proinflammatorisches Zytokin, IL-1, den Verlauf der Sepsis und des septischen Schocks beeinflussen, wurde in klinischen Studien die Produktion dieser proinflammatorischen Mediatoren neutralisiert, in der Hoffnung, einen günstigen Verlauf des Krankheitsgeschehens zu erreichen. Die meisten dieser Studien waren jedoch in ihrem Ergebnis enttäuschend und zeigten eine höhere Mortalität als bei mit Placebo behandelten Patienten [83-85]. Eine Anti- $TNF\alpha$ -Therapie wurde zwar in Tierversuchen erfolgreich durchgeführt bei der Verhinderung des Schocks nach einer einzelnen intravenösen oder intraperitonealen Gabe von Endotoxin (LPS) [86, 87]. In „Caecal ligation and puncture peritonitis models“, die eher der klinischen Situation entsprechen, konnten jedoch keine positiven, sondern eher schädigende Effekte erzielt werden. Gentechnisch veränderte Mäuse, denen  $TNF\alpha$  fehlt, sind zwar relativ resistent gegenüber LPS, einem wichtigen Lipopolysaccharid aus der Membran gramnegativer Bakterien, welches als extrem aktives Pyrogen wirkt. Werden Mäuse jedoch mit pathogenen Bakterien infiziert, so sterben sie im Rahmen einer Sepsis.

Die meisten der klinischen Studien, die bei Patienten im Rahmen einer Sepsis durchgeführt wurden, sei es mit spezifischen Antikörpern gegen  $TNF\alpha$ , sei es mit löslichen  $TNF$ -Rezeptoren, waren ebenfalls in ihren Ergebnissen eher ernüchternd [83-85]. In der Zusammenschau belegen die Resultate dieser Studien die Ansicht, dass die immunologische Antwort im Rahmen einer Sepsis nicht nur von einem einzelnen Faktor abhängt, sondern komplexe Mechanismen und die Balance von pro- und anti-inflammatorischen Mechanismen entscheidend sind, um bakterielle Infektionen zu kontrollieren.

Heute besteht Einigkeit darin, dass  $TNF\alpha$  das septische Geschehen gleichwohl auch positiv beeinflusst. Als gezeigt wurde, dass auch entzündungshemmende Mediatoren wie IL-10 bei septischen Patienten im Serum erhöht sind, hat man das vorher bestehende einfache Konzept eines generell überaktivierten Systems verworfen. Zur Entwicklung wirklich effektiver Strategien bei der Behandlung der Sepsis ist es wichtig, die molekularbiologischen Vorgänge in den Zellen zu kennen. Dabei darf man die einzelnen Signalwege auch nicht nur isoliert betrachten, sondern muss versuchen, die gegenseitige Interaktion und Beeinflussung der Signalwege zu verstehen.



In den aktuellen klinischen Studien wird versucht, bei der Einteilung der Patientenkollektive möglichst viele Variablen zu berücksichtigen, die nach heutigen Erkenntnissen den Krankheitsverlauf wesentlich beeinflussen. Ein entscheidender Parameter bei der Sepsis ist die Konzentration von IL-6 im Serum [88]. Bei Patienten im septischen Schock korreliert die Kombination einer hohen Konzentration der beiden Zytokine  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 mit einer schlechten Prognose für den Patienten, während man bei niedrigem IL-6-Spiegel und normalen  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentrationen keine Aussage über die Prognose des Patienten treffen kann [89, 90].

Die Phase-III-Anti- $\text{TNF}\alpha$ -Studie von Knoll Pharmaceuticals (Mount Olive, N.J.) aus dem Jahr 2003 unterscheidet sich von den früheren Studien dadurch, dass nicht nur klinische Zeichen der Sepsis, sondern auch Serumspiegel von inflammatorischen Zytokinen, insbesondere von IL-6, berücksichtigt wurden. Danach profitieren vor allen Dingen Patienten, die eine hohe Serumkonzentration an IL-6 ( $>1000$  pg/ml) aufweisen, von einer anti- $\text{TNF}\alpha$ -Therapie. In diesem Patientenkollektiv, also bei den Patienten mit besonders schlechter Prognose, konnte die Mortalität im Gegensatz zur Patientengruppe, die geringere IL-6-Serumspiegel aufwies, signifikant gesenkt werden [91]. Zukünftige Studien sollten deshalb nicht wie bisher, hauptsächlich auf klinische Entzündungszeichen ausgerichtet sein, sondern daneben auch andere Variablen berücksichtigen, um die Heterogenität der Patientenkollektive zu verringern und damit gezielt den Patienten zu helfen, die durch eine Immuntherapie profitieren können.

Ein weiterer therapeutischer Ansatz in der Behandlung der Sepsis liegt in der Kontrolle der Expression von  $\text{TNF}\alpha$ . Heute ist bekannt, dass die Expression von  $\text{TNF}\alpha$  auf verschiedenen Ebenen reguliert wird. Zum einen ist die transkriptionelle Regulation eines Gens in mRNA von Bedeutung, zum anderen gibt es im Falle von  $\text{TNF}\alpha$  in Studien überzeugende Hinweise, dass mehrere posttranskriptionelle regulatorische Mechanismen die Expression von  $\text{TNF}\alpha$  beeinflussen [92, 93].

Als zusätzliches Target zur Therapie der Sepsis könnte sich in Zukunft die MAPKAP-K2 erweisen, ein durch  $\text{TNF}\alpha$  über die  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  direkt phosphoryliertes Kernprotein, das unter anderem auch als ein Shuttleprotein fungiert, um die aktivierte  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  vom Zytosol in den Kern zu befördern [94]. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Mäuse, denen die MAPKAP-K2 fehlt, nur 10 % der  $\text{TNF}\alpha$ -Menge der Wildtypiere produzieren und zum anderen resistent gegenüber dem durch LPS induzierten Schock sind [95]. Dabei beeinflusst die MAPKAP-K2 nicht die Transkription von  $\text{TNF}\alpha$ , also die Menge an mRNA und auch nicht die Sekretion des synthetisierten Proteins, sondern reguliert die Translation der mRNA zum

fertigen Protein über bestimmte ARE (AU-rich-Elements), wobei die genauen Mechanismen und Proteine, die daran beteiligt sind, heute noch unbekannt sind [95].

## **1.7 Bedeutung von TNF $\alpha$ bei der Rheumatoiden Arthritis sowie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Therapiemöglichkeiten über die Beeinflussung der TNF $\alpha$ -Signalvermittlung**

Eine Erkrankung, bei der der TNF $\alpha$ -Signalweg eine herausragende Rolle spielt, ist die Rheumatoide Arthritis (RA), die häufigste Autoimmunerkrankung des Menschen. Obwohl die Ursache der Erkrankung bis heute ungeklärt ist, sind in den letzten Jahren wesentliche Fortschritte im Verständnis der Pathogenese erzielt und vor diesem Hintergrund sind wirkungsvolle Therapiestrategien entwickelt worden, die bei der Mehrheit der Patienten das Fortschreiten der Erkrankung verhindern können. Obwohl mehrere Zytokine an der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis beteiligt sind, liegt das Hauptgewicht für die Entstehung bei TNF $\alpha$ . Die Blockade seines Signalweges mit Hilfe von anti-TNF $\alpha$ -Antikörpern wie Infliximab oder den löslichen TNF $\alpha$ -Rezeptoren wie Etanercept führt bei der Mehrzahl der Patienten zu einer erheblichen Senkung der Krankheitsaktivität, verhindert das Fortschreiten der Erkrankung und ist heute eine wirkungsvolle Therapieoption [96]. Trotz der erzielten Fortschritte ist eine weitere Optimierung in der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis dringend notwendig. Zum einen gibt es eine Reihe von Non-Respondern auf eine Therapie mit TNF $\alpha$ -Antikörpern und löslichen TNF $\alpha$ -Rezeptoren, zum anderen sind die bisher eingesetzten Immuntherapeutika nicht nebenwirkungsfrei. So kommt es zu einer höheren Inzidenz an schwerwiegenden Infektionen, vor allem an Pneumonien [97]. Andererseits ist die Therapie mit den bisherigen Immuntherapeutika mit erheblichen Kosten verbunden.

Mit Hilfe der neuen Erkenntnisse in der Signaltransduktion von TNF $\alpha$  erhofft man sich, schon bald effektive und spezifische Möglichkeiten bei der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis zu besitzen. Die wichtigste Zielstruktur dabei ist die p38<sup>MAPK</sup>, die auch wichtig für die Synthese und Expression von TNF $\alpha$  ist [98]. Neben der Entstehung der Rheumatoiden Arthritis besitzt die p38<sup>MAPK</sup> eine Bedeutung bei der Entstehung verschiedener Krankheiten, auch anderer entzündlicher Gelenkerkrankungen, den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und dem M. Alzheimer [99-101]. Daneben scheint die p38<sup>MAPK</sup> Einfluss auf die Zellproliferation zu haben, wobei eine Überexpression zu einer verlangsamten und eine Hemmung der p38<sup>MAPK</sup> zu einer beschleunigten Proliferation führt. Desweiteren ist durch Experimente vor allem in Knockout-Mäusen eine Rolle der p38<sup>MAPK</sup> bei verschiedenen Entwicklungsprozessen nachgewiesen worden, so bei der plazentaren Angiogenese [102,

103] und bei der Erythropoese [104, 105]. Die p38<sup>MAPK</sup> selbst könnte auch ein Dreh- und Angelpunkt im Crosstalk mit anderen Signalwegen, insbesondere dem IL-6-Signalweg sein [106]. Inhibitorstudien deuten darauf hin, dass in Makrophagen die Aktivierung der p38<sup>MAPK</sup> essentiell für die TNF- $\alpha$  abhängige Expression von SOCS3 wie auch für die Hemmung der IL-6-induzierten STAT3-Aktivierung durch TNF- $\alpha$  ist [1].

Nach jahrelangen Entwicklungen sind inzwischen spezifische Inhibitoren der p38<sup>MAPK</sup> entwickelt worden, die in oraler Form verabreicht werden können und sich in Tierversuchen als effizient erweisen bei verschiedenen Arthritisformen [107]. Die Therapie mit oralen p38<sup>MAPK</sup>-Inhibitoren wäre zudem wesentlich kostengünstiger als eine anti-TNF $\alpha$ -Therapie mit Antikörpern oder löslichen Rezeptoren wie Infliximab bzw. Etanercept. In weiteren Studien wird nun untersucht werden müssen, ob die bisher erfolgversprechenden Tierexperimente sich auf den Menschen übertragen lassen.

## **1.8 Modulation der IL-6-induzierten Signalübertragung: Zytokin-„Crosstalk“ von IL-6 und TNF $\alpha$**

Ein Zytokin führt bei einer Zelle nicht immer zur gleichen Reaktion. Die intrazellulären Vorgänge werden vielmehr durch parallel agierende Faktoren modifiziert. Somit wird ein vermitteltes Signal mit den „Umfeldbedingungen“ verrechnet und die Antwort der Zelle mit diesen Bedingungen abgestimmt. So haben neuere Studien für die Sepsis beispielsweise gezeigt, dass neben TNF $\alpha$  vor allem die Konzentration von IL-6 im Serum von Patienten Einfluss auf den Erfolg einer Therapie mit TNF $\alpha$ -Antagonisten hat. Für die Rheumatoide Arthritis konnte gezeigt werden, dass eine Dysbalance beider Zytokine entscheidend ist bei der Pathogenese der Erkrankung.

Die IL-6 Signalvermittlung wird im wesentlichen durch die folgenden Mechanismen moduliert, die überwiegend inhibitorisch in den JAK-STAT-Signalweg eingreifen.

- Die Anwesenheit einer nukleären Phosphatase führt zur Dephosphorylierung und Inaktivierung aktivierter STAT-Moleküle [108]
- PIAS (protein inhibitors of activated STATs) bilden eine Familie inhibitorischer Proteine, die im Zytosol an aktivierte, tyrosinphosphorylierte STAT-Moleküle binden und dadurch deren DNA-Bindungsaktivität verringern [109, 110]. Dabei binden die einzelnen Proteine der PIAS jeweils spezifisch ein STAT-Molekül und beeinflussen dessen DNA-Bindungsaktivität.
- SOCS (supressors of cytokine signaling) hemmen den JAK-STAT-Signalweg über eine Bindung an die signaltransduzierende Untereinheit gp130 [32-34, 111]. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie besitzen eine zentrale SH2-Domäne und eine

C-terminale Domäne, die SOCS Box, über die ein wesentlicher Teil ihrer inhibitorischen Aktivität auf Janus-Kinasen vermittelt wird. Die Bindung von SOCS-Molekülen an Janus-Kinasen bzw. an den aktivierten Rezeptor führt zur Hemmung der Aktivität von Janus-Kinasen und damit zu einer Unterbrechung der Aktivierung von STAT-Faktoren. Sie können auch als Feedback-Inhibitoren der Signalkaskade bezeichnet werden, da sie selbst durch die Zytokine induziert werden, deren Signale sie auch hemmen [111, 112]. Yasukawa hat zeigen können, dass Mäuse, in deren Makrophagen und neutrophilen Granulozyten SOCS3 nicht exprimiert wird, wesentlich resistenter gegen akute Entzündungsreize sind [21]. In diesen Tieren wird die Produktion von entzündungsfördernden Mediatoren wie TNF $\alpha$  und IL-12 unterdrückt. In den Zellen kann der JAK-STAT-Signalweg verstärkt und verlängert ablaufen und IL-6 wirkt dort als entzündungshemmendes Zytokin [21]. Dies legt den Schluss nahe, dass SOCS3 im Falle der IL-6-Signalvermittlung, einem molekularen Schalter vergleichbar, die STAT3-Aktivierung der IL-6-Signalvermittlung supprimiert.

- Kürzlich wurde herausgefunden, dass die Tyrosinphosphatase SHP2 ebenfalls zu einer Hemmung des IL-6-Signalweges führt [113, 114]. Sie wird Jak1-abhängig Tyrosin-phosphoryliert über eine spezifische Phosphotyrosin/SH2-Domänen-Interaktion an den zytoplasmatischen Teil der signalvermittelnden gp130-Untereinheit des IL-6-Rezeptorkomplexes rekrutiert [29]. Die Ermittlung der Bedeutung der SHP2 für die Modulation der IL-6-Signaltransduktion durch TNF $\alpha$  ist wesentlicher Bestandteil der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studien.
- Eine weitere Funktion bei der Modulation des JAK-STAT-Signalings durch IL-6 besitzt das Tyrosinmotiv 759 der signaltransduzierenden Untereinheit gp130 des IL-6-Rezeptorkomplexes. Es ist die Bindungsstelle sowohl für die SHP2 als auch für SOCS3, die beide hemmend auf das JAK-STAT-Signaling wirken. Mutationen des Tyrosins 759 von gp130 führen zu einer verstärkten und verlängerten STAT1 und STAT3-Aktivierung sowie zu verstärkter Geninduktion von STAT-induzierten Genen durch IL-6 [113-115].
- Verschiedentlich wurde gezeigt, dass die Serinphosphorylierung der STATs deren DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität beeinflusst, wobei die genaue Bedeutung der Serinphosphorylierung der STAT-Moleküle bis heute noch nicht geklärt ist und auch vom zellulären Kontext abhängig ist. Für STAT3 existieren Arbeiten, in denen die Phosphorylierung des Serins 727 von STAT3 zur verstärkten Aktivität von Transkriptionsfaktoren [116, 117] und gesteigerter DNA-Bindung [118-120] führt. Daneben ist aber auch eine verminderte transkriptionelle Antwort unter einer Serinphosphorylierung von STAT3 beschrieben [121-124].

- Weitere Mechanismen, die neben inhibitorischen Molekülen für eine Inaktivierung des JAK-STAT-Signalweges verantwortlich gemacht werden können, sind die Inaktivierung von JAK oder STAT durch Dephosphorylierung über Tyrosin-Phosphatasen [113, 114], der Abbau von STATs über das Proteasom [125] und eine möglicherweise über MAP-Kinasen vermittelte Phosphorylierung der signaltransduzierenden Untereinheit gp130 des IL-6-Rezeptors [126].
- In hämatologisch-onkologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass nicht nur Tyrosin-Kinasen der Janus-Kinasen-Familie für die Phosphorylierung von STAT-Faktoren verantwortlich sind, sondern beispielsweise auch Mitglieder der Src-Kinasen-Familie eine Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT-Faktoren bewirken [127-129]. Dabei scheint das Transformationspotential der viralen Src-Analoga v-Src oder v-Abl direkt abhängig von einer konstitutiven Aktivierung von STAT-Faktoren zu sein [128, 129]. Daneben konnte gezeigt werden, dass vor allem das für die Pathogenese der chronisch myeloischen Leukämie relevante BCR-Abl-Onkogen zu einer konstitutiven Aktivierung von STAT-Faktoren führt, die für die maligne Transformation betroffener Lymphozyten essentiell ist. In sich anschließenden Untersuchungen zeigte sich, dass auch andere virale oder zelluläre Src-Kinasen wie c-Src, Lck oder v-FPS an der physiologischen wie auch pathologischen Aktivierung von STAT-Faktoren beteiligt sind [130]. Src-Kinasen werden als Integrationspunkt zahlreicher Signale, insbesondere für zellulären Stress angesehen, so dass angenommen werden kann, dass andere Mediatoren durch die Beeinflussung der Aktivität der Src-Kinasen modulierend in die Signalvermittlung entsprechender Zytokine eingreifen können.

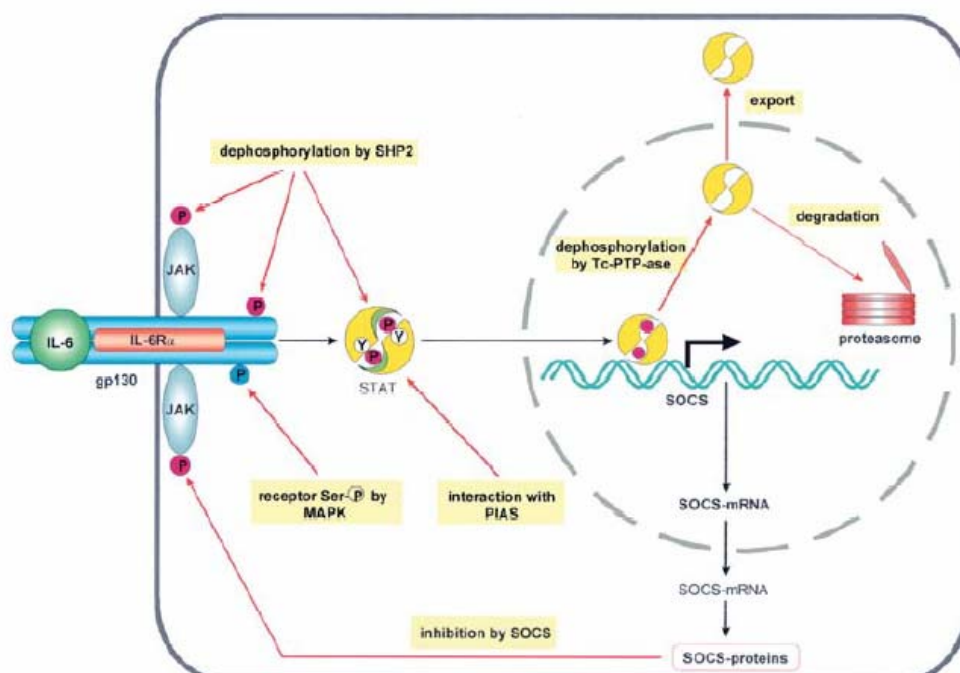


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Angriffspunkte zur Modulation des IL-6-Signaling

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper

4G10-Phosphotyrosin	monoclonal	(Upstate)
gp130 (M20)	polyclonal	(Santa-Cruz)
p38 (HOG-1)	polyclonal	(Stressgen)
p38 (C20)	polyclonal	(Santa Cruz)
Phospho-p42/p44 MAPK (Thr202/Tyr204) (P-ERK)	monoclonal	(Cell Signaling)
p42/p44 MAPK (ERK)	polyclonal	(Cell Signaling)
Phospho-Stat3 (Ser 727)	polyclonal	(Cell Signaling)
Phospho-Stat3 (Tyr 705)	polyclonal	(Cell Signaling)
SH-PTP2 (C18)	polyclonal	(Santa-Cruz)
Stat3	monoclonal	(Transduction Laboratories)
YFP	monoclonal	(Santa Cruz)

#### 2.1.2 Lösungen und Puffer

##### 2.1.2.1 Puffer für Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

###### 2.1.2.1.1 5 × Gelshift-Puffer

Hepes	0,05 M
EDTA	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM
Glycerol	50%
Bromphenolblau	1%

⇒ auf einen pH-Wert von 7,8 einstellen

###### 2.1.2.1.2 10 Ansätze für einen EMSA

Gelshift-Puffer 5 ×:	40 µl
1 M DTT:	1,0 µl
200µMol PMSF:	2,0 µl
Polyldc:	10 µl
BSA	20 µl
dH <sub>2</sub> O:	22 µl

**2.1.2.1.3 Puffer A**

Hepes-KOH pH 7,9	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
KCl	10 mM

**2.1.2.1.4 Puffer C**

Hepes-KOH pH 7,9:	20 mM
NaCl	420 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
EDTA pH 8,0	0,2mM
Glycerol	25%

**2.1.2.1.5 zu Puffer A und C frisch dazugeben**

DTT	0,5 mM
PMSF	0,2 mM
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM

**2.1.2.2 Laemmli-Puffer (in wässriger Lösung)**

Glycerol:	10%
SDS:	3%
TRIS-HCl pH 6,8:	62,5 mM
Bromphenolblau:	0,01%

**2.1.2.3 TBS-T-Puffer**

TRIS:	1 M
NaCl:	0,75 M
pH:	7,6
Tween:	0,1%

**2.1.2.4 Elektrophoresepuffer**

SDS	17,5 mM
Tris	125 mM
Glycin	1,25 M

**2.1.2.5 Triton-Lysispuffer**

NaCl:	136 mM
Tris-HCl:	20 mM
Glycerol:	10%
EDTA:	2 mM
$\beta$ -Glycerophosphat:	50 mM
Na-Pyrophosphat:	20 mM
Pefablock:	0,2 mM
Aprotinin:	5 $\mu$ g/ml
Leupeptin:	5 $\mu$ g/ml
Benzamidin:	4 mM
$\text{Na}_3\text{PO}_4$ :	1 mM

**2.1.2.6 Brij-Lysispuffer:**

Tris pH 7,5:	200 mM
NaCl:	150 mM
EDTA pH 8,0:	1 mM
NaF:	10 mM
Brij-97 :	1 %
Glycerol:	15 %
$\text{Na}_3\text{VO}_4$ :	1 mM
PMSF:	1 mM
Aprotinin:	5 $\mu$ g/ml
Leupeptin:	5 $\mu$ g/ml

**2.1.2.7 Brij-Waschpuffer (Salzfrei):**

Tris HCl pH 7,5 :	20 mM
EDTA pH 8,0 :	1 mM
$\text{Na}_3\text{VO}_4$ :	1 mM
PMSF:	1 mM
Brij-97:	0,1 %



**2.1.2.8 Rehydrierungslösung für 2D-Elektrophorese**

Harnstoff:	8 M
Triton X-100	2 %
IPG-Puffer:	0,5 %
Bromphenolblau:	wenige Körnchen

**2.1.2.9 Äquibrierlösung für 2D-Elektrophorese**

Tris HCl pH 8,8 :	50 mM
Harnstoff :	6 M
Glycerol (87 %):	30 %
SDS:	2 %
Bromphenolblau:	wenige Körnchen

**2.1.3 Agarose-sealing-solution**

Agarose	0,5 %
Elektrophoresepuffer	99,5 %
Bromphenolblau	Körnchen

**2.1.4 Western-Blot-Puffer****2.1.4.1 Anode-I-Puffer**

TRIS	0,3 M
Methanol	20%

**2.1.4.2 Anode II-Puffer**

Tris	0,025 M
Methanol	20%

**2.1.4.3 Kathodenpuffer**

6-Aminocaprinsäure	0,04 M
Methanol	20%

## **2.1.5 Zelllinien**

### **2.1.5.1 RAW 264.7-Zellen**

Raw 264.7 ist eine peritoneale Makrophagenzelllinie der Maus, die mit dem Abelson-Leukämie-Virus transformiert wurde. Die Zellen wurden mit „Dulbecco’s MEM mit Glutamax-I-Medium mit 4500 mg/l Glucose“, dem 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum zugesetzt wurde, in 250 ml-Zellkulturflaschen kultiviert. Der Medienwechsel erfolgte alle ein bis zwei Tage. Zum Splitten der Zellen und für die Versuche wurden die Zellen in frischem Medium mit einem Plastischaber von der Zellkulturflasche abgekratzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre.

### **2.1.5.2 NiH-3T3-Zellen**

NiH-3T3-Zellen entstammen einer embryonalen Fibroblastenzelllinie der Maus, die nach dem 3T3-Protokoll transformiert wurde. Sie ist hervorragend für DNA-Transfektionsstudien geeignet. Die Zellen wurden mit „Dulbecco’s MEM mit Glutamax-I-Medium mit 1000 mg/l Glucose“, dem 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum zugesetzt wurde, in 250 ml-Zellkulturflaschen kultiviert. Alle ein bis zwei Tage wurde das Medium gewechselt. Zum Splitten und für die Experimente erfolgte das Lösen der Zellen in Trypsin/EDTA und die Aufnahme in Zellkulturmedium. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

### **2.1.5.3 MEF-Zellen / MEF-SHP2 trunkiert**

Mef-Zellen sind embryonale Mausfibroblasten. Sie wurden in „Dulbecco’s MEM mit Glutamax-I-Medium mit 1000 mg/l Glucose“, dem 10%-iges hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum zugesetzt wurde, in 250 ml-Zellkulturflaschen kultiviert. Alle ein bis zwei Tage erfolgte ein Wechsel des Mediums. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturflasche gelöst und in Medium aufgenommen.

Für einige Experimente wurden auch MEF-SHP2-mutierte Zellen verwendet. Sie stammen ursprünglich von B.G. Neel (Boston, MA) und wurden freundlicherweise von Dr. Fred Schaper zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Zellen sind mausembryonale Fibroblasten, die aus Mäusen isoliert wurden, denen das Exon 3 der SHP2 fehlt. Sie exprimieren ein funktionsloses mutiertes SHP2-Protein, dem 65 Aminosäuren innerhalb der N-terminalen SH2-Domäne fehlen. Im Vergleich mit dem Wildtypzellen konnte mit ihrer Hilfe die Bedeutung der SHP2 genauer untersucht werden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre. Für die verwendeten Experimente wurden ausschliesslich niedrig passagierte Zellkulturen verwendet.

### 2.1.6 EMSA-Sonden

Für die Bestimmung der STAT3-DNA-Bindungsaktivität wurde eine für die STAT3-Bindung optimierte, aus dem SIE (SIS-inducible element) des c-fos-Promotors abgeleitete Sequenz verwendet. Sie lautet: 5'-GATCCGGGAGGGATTTACGGGAAATGCTG-3'

Die Labeling-Reaktion, in der die Sonde mit alpha-P<sup>32</sup>-ATP (MP Biomedicals, Eschwege) radioaktiv markiert wurde, erfolgte mittels des High Prime Labeling Kit (Roche, Mannheim). Die überschüssigen Nukleotide wurden mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden) entfernt.

### 2.1.7 Plasmide

#### 2.1.7.1 PGL3- $\alpha$ 2M-215Luc

Dieses Plasmid kodiert für das Luciferasegen unter Kontrolle der 5'-regulatorischen Sequenz des  $\alpha$ 2-Makroglobulinpromotors der Ratte von Base -215 bis 18.

#### 2.1.7.2 p38 (AF) (dominant negative p38<sup>MAPK</sup>)

Das Konstrukt stammt von Prof. Dr. Ludwig. In den kRSPA-Vektor ist die flag-getaggte murine p38dn über die Schnittstellen HINDIII und XBA-I einkloniert. Bei der vorliegenden dominant negativen Form der p38<sup>MAPK</sup> sind über eine Punktmutation die Aminosäuren Threonin und Tyrosin durch die Aminosäuren Alanin und Phenylalanin ausgetauscht. Dadurch fungiert das Protein als Substratfalle.

#### 2.1.7.3 EPO/gp130-Rezeptorkonstrukte

Alle verwendeten EPO/gp130 Rezeptorkonstrukte wurden freundlicherweise von Dr. Fred Schaper zur Verfügung gestellt.

Der Expressionsvektor pSVL-EG enthält die kodierende Sequenz des EPO/gp130-Rezeptorchimärs. Der extrazelluläre Teil des Erythropoetinrezeptor ist dabei mit dem zytoplasmatischen und dem transmembranösen Anteil des gp130-Rezeptors fusioniert. Über Stimulation der transfizierten Zellen mit Erythropoetin wird der IL-6-Signalweg aktiviert, wobei durch die verschiedenen Mutationen des zytoplasmatischen Anteils von gp130 differentiell die Bedeutung unterschiedlicher Motive untersucht werden kann [131]. Die für die Experimente verwendeten nichttransfizierten Zellen exprimieren keinen Erythropoetinrezeptor, so dass eine Stimulation mit Erythropoetin selektiv zur Aktivierung des IL-6-Signalweges über die transfizierten EPO/gp130-Konstrukte führt, also die Zellen, die auch erfolgreich transfiziert wurden.

Für die durchgeführten Experimente wurden neben dem Wildtyp-gp130-Rezeptorchimär modifizierte Konstrukte verwendet, wobei einzelne Tyrosinmotive des gp130-Rezeptors durch Phenylalanine ersetzt sind.

Das verwendete Konstrukt pSVL-EG(YYYYYY) kodiert für den EPO-Rezeptor, fusioniert mit dem zytoplasmatischen Anteil von gp130.

Beim Konstrukt pSVL-EG(YFYYYY) ist das bedeutsame Tyrosinmotiv 759 des gp130-Rezeptors mutiert und somit funktionslos.

Beim pSVL-EG(FFFFFF) sind alle sechs Tyrosinmotive des gp130-Moleküls durch Phenylalanine ersetzt.

#### **2.1.7.4 Plasmide des „PathDetect trans-reporting system“ (Stratagene)**

Der pFR-Luc-Vektor kodiert eine Sequenz von fünf GAL4 Bindungselementen, die mit der luciferasekodierenden Sequenz fusioniert sind.

pFA2-ELK1 ist ein Transaktivator-Plasmid, das ein Fusionsprotein exprimiert, bestehend aus der Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors ELK1, der mit der GAL4-Bindungsdomäne der Hefe fusioniert ist.

#### **2.1.7.5 pCBC1-SHP2WT (SHP2-Wildtyp)**

Das Konstrukt kodiert für die Tyrosinphosphatase SHP2, einkloniert in den PBC-SYPMYC-Neo-Vektor. Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. Fred Schaper zur Verfügung gestellt.

### **2.1.8 Restriktionsenzyme**

BAMH-I	(New England Biolabs)
Eco-R-I	(New England Biolabs)
HIND-III	(Roche)
XHO-I	(New England Biolabs)

### **2.1.9 Nukleinsäureaufreinigung**

HiSpeed Plasmid Maxi Kit	(Qiagen, Hilden)
QIAprep Spin Miniprep Kit	(Qiagen, Hilden)
QIAshredder	(Qiagen, Hilden)

### 2.1.10 PCR und Klonierung

DNA Polymerase I Large Fragment (Klenow)	(New England Biolabs, Frankfurt)
dNTP Mix	(Eppendorf, Hamburg)
LigaFast Rapid DNA Ligation System	(Promega, Mannheim)
IPTG	(Promega, Mannheim)
Oligonukleotide	(MWG, Ebersberg)
JM109 Competent Cells	(Promega, Mannheim)
pGEM-T Easy Vector System I	(Promega, Mannheim)
QIAquick Gel Extraction Kit	(Qiagen, Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	(Qiagen, Hilden)
Sequenzierreaktionen	(MWG, Ebersberg)
Taq Polymerase	(Roche, Mannheim)

### 2.1.11 Proteinaufreinigung, Immunpräzipitation und Western Blot

Bio-Rad Protein Assay	(Bio-Rad, München)
Hybond-P PVDF Membrane	(Amersham, Freiburg)
Protein A-Agarose	(Roche, Mannheim)
Protein A-Sepharose	(Roche, Mannheim)
Rainbow recombinant protein molecular weight markers	(Amersham, Freiburg)

### 2.1.12 Zellkultur und Transfektion

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	(Invitrogen, Karlsruhe)
Fötale Kälberserum	(Perbio, Bonn)
OptiMEM	(Invitrogen, Karlsruhe)
Lipofectamine 2000	(Invitrogen, Karlsruhe)

### 2.1.13 Zytokine

murines IL-6	(Peprotech, London)
rekombinantes humanes IL-6	(Inst. für Biochemie, Aachen)
humanes TNF- $\alpha$	(Roche, Mannheim)
murines TNF- $\alpha$	(Roche, Mannheim)
rekombinantes murines Erythropoietin	(Roche, Mannheim)

### 2.1.14 Medien

#### 2.1.14.1 LB-Medium

Bacto-Trypton	1 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	85 mM
Tris pH 7,6	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM

#### 2.1.14.2 SOC-Medium

Trypton	2 g
Hefeextrakt	0,5 g
NaCl	10mmol/l
KCl	2,5 mmol/l
MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	10 mmol/l
Glucose	20 mmol/l

→ pH 7 einstellen, bis auf 100 ml auffüllen und sterilfiltrieren

### 2.1.15 Antibiotika

Ampicillin	(Fluko)
Penicillin-Streptomycin	(Cytogen)
Gentamycin	(Cytogen)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Transfektion von Zellen für Reporter-Gen-Assays

Zur Durchführung von Reportergenassays wurden NiH-3T3- oder MEF SHP2-wt- und MEF SHP2-mutierte Zellen mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) wie folgt transfiziert. Die Zellen wurden auf 12-well Platten mit DMEM mit 4500 mg Glukose/l, dem 10%iges hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum zugesetzt war, kultiviert, bis sie eine Dichte von 80-95% erreicht hatten. Eine Stunde vor der Transfektion wurden die Zellen auf 1 ml OptiMEM-Medium umgesetzt. 6 µl Lipofectamine 2000 und insgesamt 1,5 µg DNA wurden vorher in jeweils 100 µl OptiMEM aufgenommen. Anschließend wurden beide Ansätze gut miteinander vermischt, 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und danach zu den Zellen gegeben. 16 Stunden später wurde das Medium auf DMEM mit 4500 mg Glukose/l plus 10% fötales Kälberserum, Streptomycin (100 mg/l) und Penicillin (60 mg/l) umgesetzt. Die Zellen wurden stimuliert, wie in den Versuchen angegeben. Die Zelllysate und Luciferase-Assays wurden mit dem Dual-Luciferase-Kit (Promega, Madison, WI) durchgeführt, wie in den Anweisungen des Herstellers beschrieben. Die Luciferase-Aktivität wurde anschließend mit der Transfektionseffizienz verrechnet, die durch den kotransfizierten Renilla-Expressionsvektor (Promega, Madison, WI) bestimmt werden konnte.

### 2.2.2 Transfektion für Zelllysate

Um eine höhere Transfektionseffizienz zu erreichen, wurden die Zellen nach einem modifizierten Transfektionsschema mit Lipofectamine 2000 transfiziert. Dazu wurden zum einen 6 µl Lipofectamine 2000 in 250 µl OptiMEM und zum anderen 4 µg DNA in 50 µl OptiMEM verdünnt. Beide Ansätze wurden gut miteinander vermischt und anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Unterdessen wurde eine konfluente Flasche (75 cm<sup>2</sup>) NiH-3T3-Zellen trypsinisiert. Nachdem sich die Zellen von der Flasche abgelöst hatten, wurden sie in 10 ml Medium (DMEM mit 4500 mg Glukose/l plus 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum) aufgenommen. Nach Zentrifugation über 5 Minuten bei 1000 rpm bei 4°C wurden die Zellen in 3,5 ml Medium (DMEM mit 4500 mg Glukose/l plus 10% fötales Kälberserum) resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl der resuspendierten Zellen zum Transfektionsansatz gegeben. Nach Hinzugabe von 1 ml Medium (DMEM mit 4500 mg Glukose/l plus 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum) zum Transfektionsansatz wurden die Zellen auf 60 mm Kulturschalen ausgesät. Nach 12-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurde das Medium ersetzt durch DMEM mit 4500 mg Glukose/l plus 10% fötales Kälberserum, Streptomycin (100 mg/l) und Penicillin (60 mg/l) und die Zellkultur wurde für 24 Stunden weitergezüchtet. Anschliessend wurden die Versuche durchgeführt.

### **2.2.3 Transfektion für die Fixierung von Zellen auf Objektträgern für das konfokale LSM**

Die Zellen wurden mit Lipofectamine 2000 in 24-Well-Platten auf sterile Deckgläser transfiziert. Pro Ansatz wurde 1 µg DNA mit OptiMEM auf ein Volumen von 15 µl gebracht. In einem zweiten Ansatz wurde 1 µl Lipofectamine 2000 mit OptiMEM auf ein Volumen von 50 µl verdünnt. Beide Ansätze wurden gut miteinander vermischt und anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde eine konfluente Flasche (75 cm<sup>2</sup>) NIH-3T3-Zellen trypsinisiert. Nachdem sich die Zellen von der Flasche abgelöst hatten, wurden sie in 10 ml Medium (DMEM mit 4500 mg Glukose/l plus 10% fötales Kälberserum) aufgenommen. Nach Zentrifugation über 5 Minuten bei 1000 rpm und 4°C wurden die Zellen in 8 ml Medium (DMEM mit 4500 mg Glukose/l plus 10% fötales Kälberserum) resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl der resuspendierten Zellen zum Transfektionsansatz gegeben. Am folgenden Tag wurden die Zellen für die Versuche verwendet.

Nach Stimulation der Zellen mit den entsprechenden Zytokinen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden drei mal mit sterilem PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde mit 500 µl 5% Paraformaldehydlösung bei Raumtemperatur fixiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Deckgläser auf Objektträger in 2 µl Vectashield-Medium übertragen. Die Deckgläser wurden mit Nagellack abgedichtet und bei 4°C gelagert.

### **2.2.4 Herstellung von Zelllysaten (für Western Blot)**

Zellen wurden für die Experimente bis zu einer Zelldichte von 70-90% in 60 oder 100 mm Zellkulturschalen kultiviert und dann mit den jeweiligen Zytokinen in entsprechenden Konzentrationen stimuliert. Anschließend wurden sie zweimal mit PBS, dem 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> zugesetzt wurde, gewaschen, bevor sie mit 0,6 bzw. 1 ml Triton-Lysispuffer über 20 Minuten bei 4°C lysiert wurden. Unlösliche Zellbestandteile wurden über eine Zentrifugation über 20 Minuten bei 14000 rpm vom Zelllysate getrennt. Aus dem Lysat wurde die Proteinbestimmung mittels Bradford-Reagenz (Biorad, München) durchgeführt.

### **2.2.5 Herstellung von Kernextrakten**

Auf 60 mm-Kulturschalen wurden die Zellen bis zu einer Dichte von 70-90% kultiviert. Nach Stimulation über die benötigten Zeiträume mit den entsprechenden Zytokinen wurden die Zellen 2 mal mit PBS (Biochrom, Berlin), dem 100 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> zugesetzt wurde, gewaschen und anschließend in Eppendorfgefäße überführt. Das überstehende PBS wurde nach Zentrifugation abgesaugt und die Zellen in 400 µl Puffer A aufgenommen. Nach einer Inkubation auf Eis über 10 Minuten wurden die Proben erneut zentrifugiert, um



anschliessend den Überstand (zytoplasmatisches Extrakt) abzusaugen und die Zellkerne in 100 µl Puffer C aufzunehmen. Hiernach erfolgte eine erneute Inkubation über einen Zeitraum von 30 Minuten auf Eis. Um die unlöslichen Zellmaterialien abzutrennen wurde erneut zentrifugiert und der Überstand (Kernextrakte) in neue Eppendorfgläser überführt. Vom Überstand wurde eine Proteinbestimmung mittels Bradford-Reagenz (Biorad, München) durchgeführt. Schliesslich wurden die Proben für die Versuche verwendet oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **2.2.6 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)**

Für den EMSA wurden zwischen 5 µg und 10 µg Protein eingesetzt, das Endvolumen betrug 9,5 µl. Dazu wurden 10 µl Puffermix (2x Gelshiftpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 8% Glycerin), 0.2 µg/µl BSA, 0.1 µg/µl PolydIdC, 5 mM PMSF, 10 mM DTT) gegeben. Zu dem Puffermix wurde vorher 20.000 cpm einer radioaktiv markierten Sonde gegeben, die mit dem High Prime Labelling Kit (Roche, Mannheim) und mit  $\alpha\text{-P}^{32}\text{-dATP}$  (MP Biomedicals, Eschwege) gelabelt wurde. Zur Bestimmung der STAT3-Aktivierung wurde als Sonde das mutierte m67SIE-Nukleotid (SIS-inducible element) aus dem c-FOS-Promotor verwendet. Die Labeling-Reaktion, in der die Sonde mit  $\alpha\text{-}^{32}\text{P-ATP}$  radioaktiv markiert wurde, erfolgte mittels des High Prime Labeling Kits (Roche, Mannheim). Die Protein/DNA-Komplexe wurden anschließend auf einem 4.5% Polyacrylamid (PAA) Gel (7.5% Glycerol, 0.25x TBE (20 mM Tris Base, 20 mM Borsäure, 0.5 mM EDTA, pH 8)) aufgetragen und bei 20 V/cm für 4 h elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in 10% Methanol und 10% Essigsäure für 30 min fixiert, dann getrocknet und autoradiografiert.

### **2.2.7 Ko-Immunpräzipitation (Auffrennung von Zelllysaten über die SDS-Gelelektrophorese )**

Zelllysate wurden für 3 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf einem Überkopfschüttler mit spezifischen Antikörpern und Protein-A-Agarose (10 mg/ml in Triton-Lysis-Puffer) inkubiert. Durch das anschliessende dreimalige Waschen mit jeweils 1 ml Triton-Waschpuffer wurde das Zelllysate vom Agarose-Antikörper-Proteinkomplex abgetrennt. Nach dem Waschen wurde der Agarosekomplex in 25 µl Laemmli-Puffer aufgenommen und entweder eingefroren oder sofort für die Weiterführung des Versuches verwendet. Die Proben wurden fünf Minuten bei  $95^{\circ}\text{C}$  aufgeköcht, um nach Zentrifugation auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen zu werden.

### 2.2.8 Ko-Immünpräzipitation (Auffrennung von Zelllysaten über die zweidimensionale Elektrophorese)

Zunächst wurden Zelllysate wie oben beschrieben hergestellt, mit dem einzigen Unterschied, dass anstelle von Triton-Lysispuffer Brij-Lysispuffer verwendet wurde. Die Lysate wurden über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler mit spezifischen Antikörpern und Protein-A-Sepharose (4 mg/Ansatz) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Sepharosekomplexe mit salzfreiem Brij-Waschpuffer wurden sie in 60 µl salzfreiem Brij-Puffer, dem etwas Bromphenolblau zugesetzt war, aufgenommen. Die Proben konnten dann entweder eingefroren oder sofort für die zweidimensionale Auffrennung verwendet werden.

### 2.2.9 Zweidimensionale Elektrophorese mit immobilisiertem pH-Gradienten

Rehydratisierung der IPG-Strips:

Die IPG-Strips wurden in 340 µl Rehydratisierungslösung, die mit 12µl/ml DTT versetzt wurde, über mindestens 10 Stunden rehydratisiert.

Isoelektrische Fokussierung:

Die rehydratisierten Strips wurden mit deionisiertem Wasser ab gespült und in die vorgesehenen Strip-Holder gelegt. Die Elektrodenpads wurden auf den IPG-Strips platziert. Nach Überschichten der IPG-Strips mit Cover Fluid wurde die Probe, der zuvor 2,6 µl DTT (1,5 M) zugegeben wurde, über ein Sample Cup nahe der Anode aufgetragen. Die isoelektrische Fokussierung der Proteine wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

	Spannung [V]	Zeit [h]	
1	300	3:00	Step-n-hold
2	600	3:00	Gradient
3	1000	3:30	Gradient
4	8000	5:30	Gradient
5	8000	4:00	Step-n-hold

Im Anschluss an die isoelektrische Fokussierung wurde der IPG-Strip über 15 Minuten in 5 ml Äquibrierlösung und 50 µl DTT äquibriert. Der IPG-Strip wurde dann mit deionisiertem Wasser ab gespült, kurz in Elektrophoresepuffer getaucht und auf das Elektrophoresegel

aufgelegt. Nach dem Aushärten der Agarose-sealing-solution, mit der der IPG-Strip überschichtet wurde, liefen die Proteine bei einer Spannung von 160 V in das Gel ein. Die Auftrennung erfolgte bei 240 V.

### **2.2.10 Silberfärbung**

Die Gele wurden mit dem „Silver-Staining-Kit“ der Firma Amersham gefärbt.

### **2.2.11 Western Blot**

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden über eine angelegte Spannung nach der „halbtrockenen“ Westernblotmethode vom Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) transferiert. Die PVDF-Membran wurde vor dem Transfer mit Methanol hydrophilisiert und in Anode-II-Puffer eingelegt, anschliessend auf fünf übereinander gelegte mit Anode-I-Puffer und drei mit Anode-II-Puffer getränkte Whatman-Paper gelegt. Dann wurde das Gel, gefolgt von fünf Lagen in Kathodenpuffer getränktem Filterpapier, auf die PVDF-Membran aufgelegt. Der Elektrotransfer der Proteine verlief über 1,5 Stunden bei einer Stromstärke, die sich nach folgender Formel errechnet:  $I \text{ [mA]} = 0,8 \times \text{Fläche des Gels [cm}^2\text{]}$ . Zur Absättigung der freien Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran für 45 Minuten bei Raumtemperatur in 5%-iger Blockierlösung geschwenkt. Je nach eingesetztem Antikörper wurde dafür entweder 5% Milchpulver oder BSA in TBS-T gelöst. Anschliessend erfolgte die Inkubation mit Primärantikörpern in entsprechenden Konzentrationen bei 4°C über Nacht. Vor Inkubation mit den Sekundärantikörpern wurde die Membran 3 mal 20 Minuten in TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte 1 Stunde bei 4°C. Anschliessend wurde die PVDF-Membran erneut 3 mal 20 Minuten mit TBS-T gewaschen, bevor die Proteine detektiert werden konnten. Die Detektion erfolgte nach der ECL-Methode (Enhanced Chemoluminescence) mit Lösungen der Firma Amersham und wurde wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben durchgeführt.

### **2.2.12 Transformation von Bakterien**

Zur Bakterientransformation wurden chemisch kompetente Bakterien (*E. coli*) mittels Hitzeschock transformiert. Die zu transformierenden Plasmide wurden zu den kompetenten Bakterien gegeben, 10 Min. auf Eis inkubiert und für 45-50 s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Anschliessend wurden die Bakterien für 2 Min. auf Eis gestellt und danach zu 900 µl vorgewärmtem SOC-Medium gegeben. Die Kulturen wurden 60 Minuten bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurden die Aliquots der Kulturen auf entsprechende Agarplatten ausplattiert und über einen Zeitraum von 12 bis 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

Für die DNA-Isolation aus den Bakterien wurde die Methode der alkalischen Lyse eingesetzt. Dafür wurden die Mini- und Maxi-Plasmidreinigungskits der Firma Quiagen nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Nukleinsäurekonzentration wurde spektroskopisch ermittelt. Dabei wurde die Extinktion der Lösungen bei 260 nm bestimmt.

### **2.2.13 Agarosegelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von DNA in einer Matrix aus Agarose. Die Prozentigkeit bestimmt die Maschenweite des Gels. Durch Anlegen einer Spannung können die negativ geladenen Nukleinsäuren im Elektrischen Feld nach ihrer Größe getrennt werden. Für die DNA-Trennung wurden 0,8-1,5 %ige Agarosegele in 1xTAE-Puffer bei einer Spannung von 100-150 V genutzt. Als Größenstandard wurde die 10 kb-Leiter von Eurogentec verwendet. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte über eine Färbung in einer Ethidiumbromidlösung (50µg/ml) und anschließender Detektion auf einem UV-Betrachter sowie Dokumentation mit einer Polaroid-Kamera.

### **2.2.14 Luciferase Assay**

24-48 h nach Transfektion der Zellen wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden mit 2 ml PBS gewaschen und anschliessend mit 200 µl 1 x Lysis-Reagenz (Promega) für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zelllysate wurden komplett abgenommen und für 20 Min bei 8000 rpm zentrifugiert. 10 µl Probe und 50 µl Luciferase Assay Substrat (Promega) wurden gemischt und in einem Biolumaten für 7 Sekunden gemessen.

### **2.2.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

PCRs wurden mit dem Ampli-Taq-System nach folgendem Verfahren durchgeführt:

Gesamtansatz: 50 µl

5 µl 10-fach Puffer (+Mg)

5 µl dNTP (2,5 mM)

3 µl Template

5 µl Primer f. (5 pmol/µl)

5 µl Primer r. (5 pmol/µl)

1 µl Taq Polymerase

26 µl ddH<sub>2</sub>O

---

initiale Denaturierung	2 Min.	95°C
25-30 Zyklen		
Denaturierung	30s	92°C
Anealing	30s	48-60°C
Elongation	45-120s	72°C
Terminale Elongation	10 Min.	72°C

Die Amplifikationsprodukte wurden in der Gelelektrophorese in 1%-igem TAE-Agarosegel aufgetrennt, fotografiert, nach Bedarf ausgeschnitten und mittels QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen aufgereinigt.

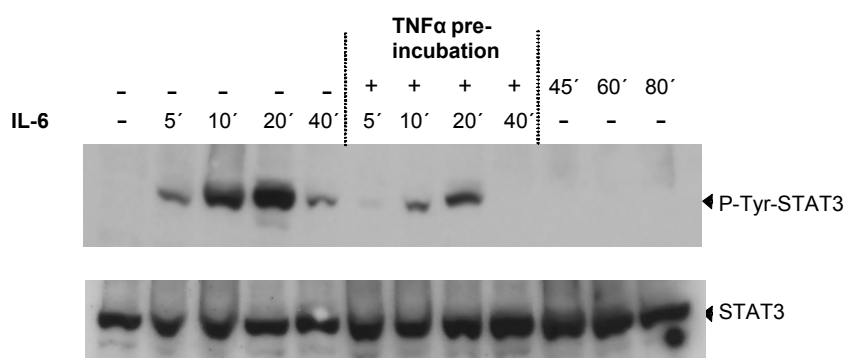
### **2.2.16 Ligation**

Die Ligation von DNA-Fragmenten fand über einen Zeitraum von drei Stunden mit der T4-DNA-Ligase (Promega) und den entsprechenden Puffern der Firmen New England Biolabs oder Promega bei 37°C statt. Dabei wurde das Insert im Überschuss mit dem Vektor im Verhältnis von etwa 3-5:1 ligiert.

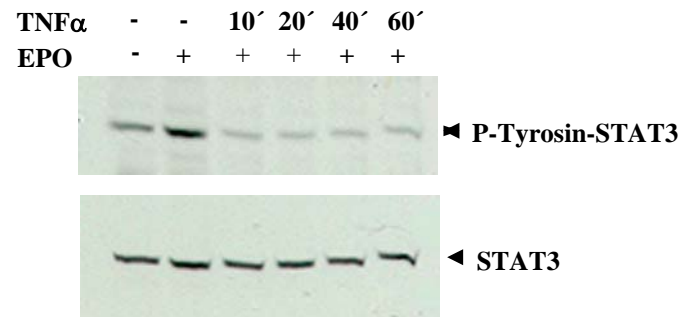
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ auf die Tyrosinphosphorylierung von STAT3

Durch frühere Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die STAT3-Tyrosinphosphorylierung durch  $\text{TNF}\alpha$  beeinflusst wird [1]. Beschrieben wird daneben von Ahmed et al. eine schnelle Hemmung der JAK-STAT-Signalvermittlung durch  $\text{TNF}\alpha$ , wobei dieser Mechanismus unabhängig von einer de novo-Proteinsynthese vermittelt werden soll [126, 132]. Wie in Abbildung 4A dargestellt, hemmt die Vorinkubation der RAW-Zellen mit  $\text{TNF}\alpha$  über einen Zeitraum von 40 Minuten die Tyrosinphosphorylierung von STAT3. Um den Einfluss und die Zeitabhängigkeit von  $\text{TNF}\alpha$  auf die Aktivierung von STAT3 zu untersuchen und zu klären, ob auch kürzere Vorinkubationen mit  $\text{TNF}\alpha$  ausreichend sind, wurde in NiH-3T3-Zellen die Tyrosinphosphorylierung von STAT3 im Zytoplasma analysiert, unter dem Aspekt, ob ein schnell wirkender Mechanismus existiert, der hemmend in den IL-6-Signalweg eingreift. Dies ist in Abbildung 4B dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass bereits eine Vorinkubation von 10 Minuten ausreichend ist, um die Tyrosinphosphorylierung von STAT3 komplett zu unterdrücken. Dies belegt, dass  $\text{TNF}\alpha$  über einen schnell wirksamen Mechanismus zur Hemmung der IL-6-Signalvermittlung führt, der auf zytosolischer Ebene die Tyrosinphosphorylierung von STAT3 blockiert. Dieser Versuch ist als Vorversuch zu sehen, bei dem gezeigt wird, dass sich NiH-Zellen ähnlich wie RAW-Makrophagen verhalten. Für diesen Versuch und für einige weitere wurden NiH-Zellen mit EPO-gp130-Konstrukten transfiziert, wobei hier die gp130-Signaltransduktion unabhängig vom spezifischen Kontext eines Zytokins untersucht werden kann durch selektive Stimulation der transfizierten Zellen, da der EPO-Rezeptor von allen nicht transfizierten Zellen nicht exprimiert wird.



**Abbildung 4A:** Nach Vorinkubation von RAW 264.7-Zellen mit  $\text{TNF}\alpha$  (10 ng/ml) über 40 Minuten wurden die Zellen mit IL-6 (200 U/ml) über die entsprechenden Zeiträume stimuliert. Gleiche Mengen an Zellysat wurden im SDS-Page aufgetrennt und durch Immunoblot mit Phospho-Tyr-STAT3- und STAT3-Antikörpern detektiert.



**Abbildung 4B:** NIH-3T3-Zellen wurden mit dem EPO/gp130-Wildtyp-Rezeptorkonstrukt transfiziert und die Aktivierung des IL-6-Signalweges wurde über Stimulation mit Erythropoetin über einen Zeitraum von 20 Minuten ausgelöst. Vor Stimulation mit Erythropoetin wurden die Zellen über Zeiträume von 10, 20, 30 oder 40 Minuten mit TNF $\alpha$  (10 ng/ml) vorinkubiert. Die Zellysate wurden über ein 8%iges SDS-Gel aufgetrennt. Der Western Blot wurde mit 5%-igem BSA geblockt, anschliessend mit dem Phospho-Tyrosin-STAT3-Antikörper (New England Biolabs) in einer Verdünnung von 1:2500 und nach dem Strippen des Blots mit dem STAT3-Antikörper (New England Biolabs) in einer Verdünnung von 1:2000 detektiert.

### 3.2 Beteiligung der p38<sup>MAPK</sup> und des Tyrosinmotivs 759 des gp130-Moleküls an der Hemmung des IL-6-Signalweges durch TNF $\alpha$

Frühere Studien, und hierbei insbesondere Inhibitorstudien, wiesen auf eine Beteiligung der p38<sup>MAPK</sup> an der Hemmung der durch IL-6 hervorgerufenen STAT-Aktivierung durch proinflammatorische Mediatoren wie beispielsweise TNF $\alpha$  hin [1, 126, 132].

Um die Bedeutung der p38<sup>MAPK</sup> in diesem Kontext spezifischer erfassen zu können, erfolgten Untersuchungen unter Verwendung einer dominant negativen Mutante der p38<sup>MAPK</sup> [133]. Hierbei handelt es sich um eine Mutante, bei der die für die Aktivierung der Kinase notwendigen Aminosäuren Threonin und Tyrosin gegen Alanin und Phenylalanin ausgetauscht wurden, so dass eine Aktivierung dieser Mutante nicht mehr möglich ist. Um elektiv transfizierte Zellen untersuchen zu können, wurde des weiteren ein chimärer Rezeptor kotransfiziert, der in seinem extrazellulären Teil aus dem Erythropoetin-Rezeptor und intrazellulär aus dem intrazellulären sowie dem transmembranösen Part der signalvermittelnden Rezeptoruntereinheit gp130 besteht [131]. Dieses Chimär erlaubt eine selektive Stimulation transfizierter Zellen mit Erythropoetin (Epo). Wie in Abbildung 5A gezeigt, hebt die Ko-Transfektion einer dominant negativen p38<sup>MAPK</sup> die Hemmung der durch Erythropoetin induzierten DNA-Bindung von STAT3 durch TNF $\alpha$  nahezu vollständig wieder auf. Vergleichbar hierzu wird der inhibitorische Einfluss von TNF $\alpha$  auf die IL-6-vermittelte transkriptionelle Aktivierung eines STAT3 responsiven Promotor-Reporter-gen-Konstruktes durch Ko-Transfektion einer dominant negativen Mutante der p38<sup>MAPK</sup> wieder fast komplett aufgehoben (Abbildung 5B). Diese Daten unterstützen die bereits von Inhibitorstudien abgeleitete Annahme, dass die Aktivierung der p38<sup>MAPK</sup> essentiell ist für die Hemmung der gp130-abhängigen Aktivierung von STAT3 [1, 134].

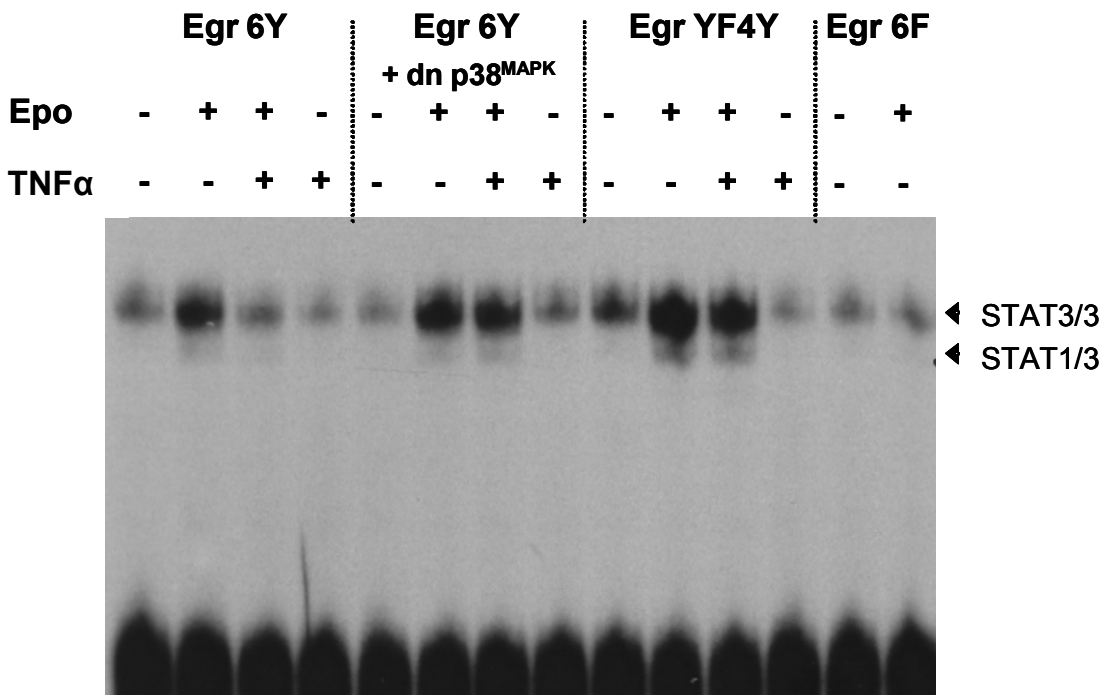
Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen belegen, dass das Tyrosinmotiv 759 des zytoplasmatischen Anteils der signalvermittelnden Rezeptoruntereinheit gp130 des IL-6 Rezeptorkomplexes relevant für die Negativ-Regulation der IL-6 abhängigen Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges ist [131, 135]. Um zu klären, inwiefern dieses Tyrosinmotiv verantwortlich für die Vermittlung des inhibitorischen Einflusses von TNF $\alpha$  auf die Aktivierung der STAT3-Signalvermittlung durch IL-6 ist, wurden Epo/gp130 Rezeptorchimäre in Kotransfektionsexperimenten verwendet, bei denen das Tyrosinmotiv 759 gegen Phenylalanin ausgetauscht wurde. Dies führte in diesem Zusammenhang nicht nur zu einer Verstärkung der Epo-induzierten DNA-Bindungsaktivität von STAT3, sondern auch zu einem vollständigen Block der inhibitorischen Aktivität von TNF $\alpha$  auf die gp130-abhängige Aktivierung von STAT3 (Abbildung 5A). Hiermit übereinstimmend wurde der inhibitorische Einfluss von TNF $\alpha$  auf die Epo-induzierte transkriptionelle Aktivierung des als STAT3



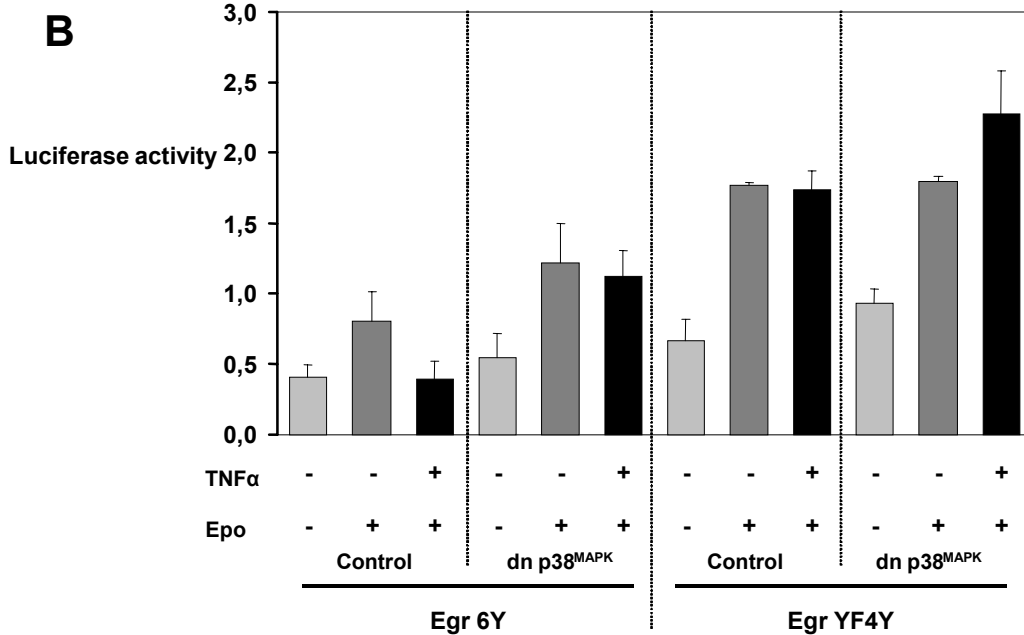
spezifischer Reporter eingesetzten  $\alpha_2$ -Makroglobulin-Promoter Reporter-Gen-Konstruktes durch Mutation des Tyrosinmotifs 759 im zytoplasmatischen Teil von gp130 nahezu vollständig gehemmt (Abbildung 5B).

Erwartungsgemäss wurde bei Transfektion des Epo/gp130-Rezeptorchimärs EGR(FFFFFF), bei dem alle Tyrosinmotive mutiert sind und damit keine STAT3-Rekrutierungsmotive zur Verfügung stehen, keine STAT3-Aktivierung durch Stimulation mit Erythropoetin beobachtet .

**EMSA**



**A**



**Abbildung 5:**

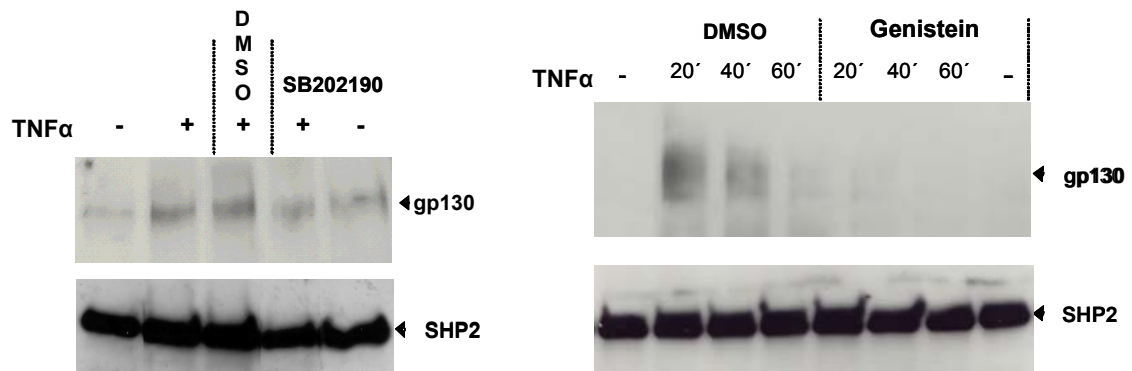
A) NIH-3T3-Zellen wurden entweder mit dem kRSPA-Leervektor oder mit einer mutierten, kinase-defizienten  $p38^{\text{MAPK}}$  (AF) (dn  $p38^{\text{MAPK}}$ ) transient kotransfiziert und zusätzlich entweder mit dem chimären Wildtyp-EPO/gp130-Rezeptorkonstrukt (EGR(YYYYYY)), mit der am Tyrosin 759 mutierten Form (EGR(YFYYYY)) oder mit der an allen sechs Tyrosinmotiven mutierten Form (EGR(FFFFFF)). Zwei Tage später wurden die Zellen mit  $\text{TNF}\alpha$  (10 ng/ml) für 40 Minuten vorstimuliert. Darauf folgte die Stimulation mit EPO (7 U/ml) über 30 Minuten. Anschließend wurden die Zellen geerntet und Kernextrakte zur Untersuchung der STAT3-Aktivierung gewonnen. Die STAT3-Aktivierung wurde durch EMSA erfasst.

B) NIH-3T3-Zellen wurden wie unter A) beschrieben co-transfiziert. Für die Analyse der transkriptionellen Aktivierbarkeit wurde aber zusätzlich der  $\alpha 2$ -Makroglobulinpromoter mit co-transfiziert. Eine zufriedenstellende Transfektionseffizienz konnte über die ausserdem mittransfizierte Renilla-Luciferase-cDNA überwacht werden. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen für 40 Minuten mit  $\text{TNF}\alpha$  (10 ng/ml) vorstimuliert. Anschließend wurde mit Erythropoetin (7 U/ml) über 10 Stunden stimuliert. Die Luciferase-Aktivität wurde in den Zellysaten bestimmt, wie im Methoden-Teil beschrieben.

### 3.3 Beeinflussung der durch $\text{TNF}\alpha$ vermittelten Rekrutierung der SHP2 an gp130 durch Hemmung der $p38^{\text{MAPK}}$ oder Protein-Tyrosin-Kinasen

Vorarbeiten anderer belegen, dass die Rekrutierung der Tyrosinphosphatase SHP2, aber auch von SOCS3, an den zytoplasmatischen Anteil von gp130 über das Tyrosinmotiv 759 durch „src homology 2 domain“ (SH2-Domänen)-Interaktionen vermittelt wird [29, 131, 135]. Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe von Jens Schweigart legen nahe, dass  $\text{TNF}\alpha$  die Rekrutierung der Tyrosinphosphatase SHP2 an gp130 induziert [2].

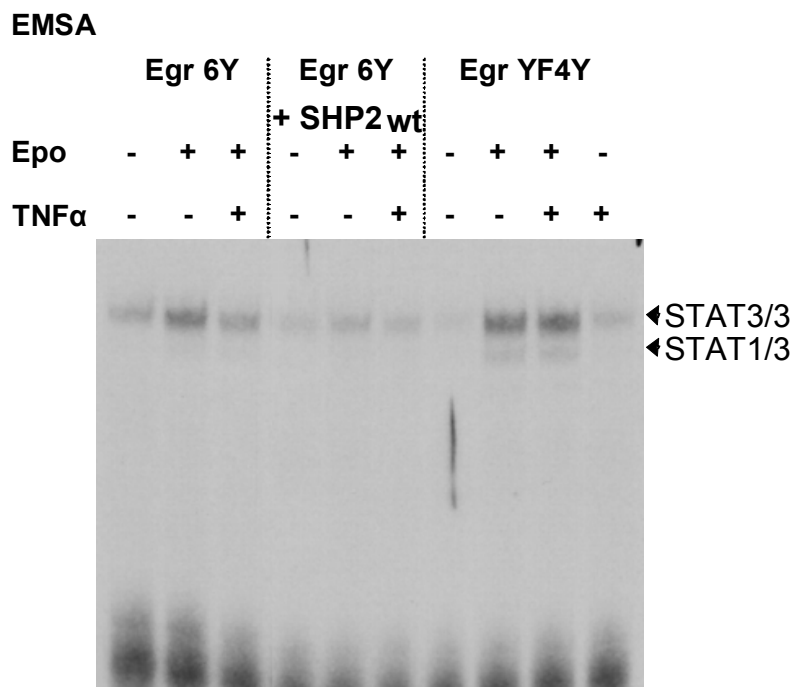
Zur Klärung der Frage, ob  $\text{TNF}\alpha$  die Rekrutierung der SHP2 an die gp130-Untereinheit des IL-6-Rezeptors möglicherweise über die  $p38^{\text{MAPK}}$  bewirkt, oder ob eine Tyrosinkinase dafür benötigt wird, wurden Koimmunpräzipitationsversuche mit Inhibitoren in RAW 264.7-Zellen durchgeführt (Abbildung 6). Demnach führt SB202190, ein spezifischer  $p38^{\text{MAPK}}$ -Inhibitor, zu einer verminderten Rekrutierung der SHP2 an gp130, genauso wie der Tyrosinkinaseinhibitor Genistein die Assoziation beider Proteine verringert. Während vor allem 20 und 40 Minuten nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  eine starke Interaktion zwischen gp130 und der SHP2 zu sehen ist, wird diese durch Vorinkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Genistein fast vollständig aufgehoben. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl die aktivierte  $p38^{\text{MAPK}}$ , als auch die Aktivität einer Tyrosinkinase für die Rekrutierung der SHP2 an gp130 durch  $\text{TNF}\alpha$  erforderlich ist.



**Abbildung 6:** Nach einer Vorinkubationszeit von 40 Minuten mit dem spezifischen p38<sup>MAPK</sup>-Inhibitor SB 202190 (10  $\mu$ M) oder dem Tyrosin-Kinasen-Inhibitor Genistein (100  $\mu$ M) wurden die für den Versuch verwendeten RAW 264.7-Zellen über 40 Minuten mit TNF $\alpha$  (10 ng/ml) stimuliert. Aus den Zellysaten wurde die Co-Immunpräzipitation wie unter Materialien und Methoden beschrieben mit 1  $\mu$ g SHP2-Antikörper durchgeführt. Nach dem Western-Blot wurde die PVDF-Membran auf einer Höhe von etwa 80 kd in zwei Teile geschnitten, mit 5% Milchpulver geblockt und anschließend wurde der obere Teil mit dem polyclonalen Antikörper gp130 (M20) (Santa Cruz) 1:2500 verdünnt, der untere Teil mit dem polyclonalen Antikörper SHPTP2 (Santa Cruz) 1:4000 inkubiert.

### 3.4 Einfluss der SHP2 auf die IL-6 induzierte STAT3-Aktivierung

Um den Einfluss der SHP2 auf die IL-6 induzierte STAT3-Aktivierung zu untersuchen, wurden EMSA durchgeführt, wobei NiH-3T3-Zellen mit einem SHP2-Wildtyp-Plasmid und den Epo/gp130-Rezeptorchimären transfiziert wurden. Wie bereits zuvor gezeigt, führt die Stimulation mit Erythropoetin zur Aktivierung von STAT3. Die Vorstimulierung mit TNF $\alpha$  hemmt jedoch die Aktivierbarkeit von STAT3 (1. Spalte). Die Überexpression der transfizierten SHP2 führt zu einer starken Hemmung der STAT3-Aktivierbarkeit, die in dem Fall auch durch alleinige Stimulation mit EPO nicht mehr auslösbar ist, wodurch das inhibitorische Potential der SHP2 bei der Signaltransduktion durch den gp130-Rezeptor zum Ausdruck kommt. Vorinkubation der Zellen mit TNF $\alpha$  führt zur kompletten Aufhebung der STAT3-Aktivierbarkeit (2. Spalte). Die Transfektion mit dem EPO/gp130-Rezeptorkonstrukt, bei dem das Tyrosin 759 mutiert ist, führt hingegen zur verstärkten STAT3-Aktivierbarkeit. In diesem Fall können weder SHP2 noch SOCS3 ihren hemmenden Einfluss auf die IL-6-Signalvermittlung ausüben. Ausserdem ist TNF $\alpha$  in diesem Fall nicht in der Lage, die durch EPO ausgelöste STAT3-Aktivierbarkeit zu verringern. Dies zeigt einmal mehr die aussergewöhnliche Bedeutung des Tyrosinmotivs 759 des gp130-Moleküls (3. Spalte).



**Abbildung 7:** NiH-3T3-Zellen wurden entweder mit dem pCBC1-Leervektor oder mit dem Expressionsplasmid pCBC1-SHP2WT (SHP2-Wildtyp) co-transfiziert. Dadurch konnte die Wildtyp Tyrosin-Phosphatase SHP2 in den Zellen überexprimiert werden. Zusätzlich wurden entweder der Wildtyp EPO-gp130-Rezeptor EGR(YYYYYY) oder der EGR(YFYYYY)-Rezeptor transfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen über 40 Minuten mit TNF $\alpha$  (10 ng/ml) vorbehandelt und anschließend mit Erythropoetin (7 U/ml) für 30 Minuten stimuliert. Danach wurden die Zellen geerntet und Kernextrakte für die Bestimmung der STAT3-Aktivierung vorbereitet, die im EMSA ermittelt wurde.

### 3.5 Rolle der SHP2 bei der Hemmung der IL-6-Signalvermittlung durch TNF $\alpha$

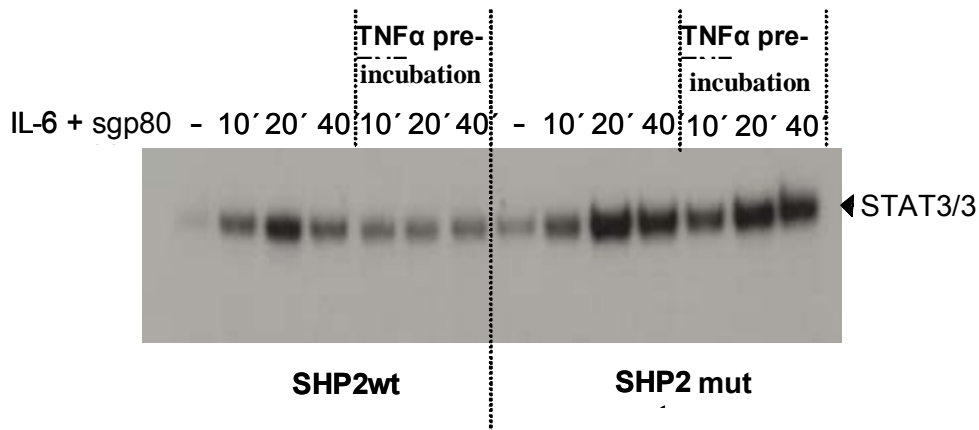
Um die Funktion der SHP2 bei der Hemmung der STAT3-Aktivierung durch TNF $\alpha$  weitergehend zu klären, wurde die STAT3-Tyrosinphosphorylierung und die STAT3-Promotoraktivität in Mausfibroblasten untersucht, denen das Exon 3 der SHP2 fehlt. Diese Zellen exprimieren ein funktionsloses SHP2-Protein, dem 65 Aminosäuren innerhalb der N-terminalen SH2-Domäne fehlen.

In den MEF-SHP2-Wildtyp-Zellen wird STAT3 durch Stimulation der Zellen mit IL-6 und der löslichen  $\alpha$ -Rezeptoruntereinheit des IL-6-Rezeptors sgp80 schon nach 10 Minuten deutlich aktiviert und erreicht sein Maximum nach 20 Minuten. Die zusätzliche Stimulation mit sgp80 ist in Fibroblasten erforderlich, da diese Zellen den zytokinbindenden Anteil des gp130-Rezeptors (gp80) nicht exprimieren.

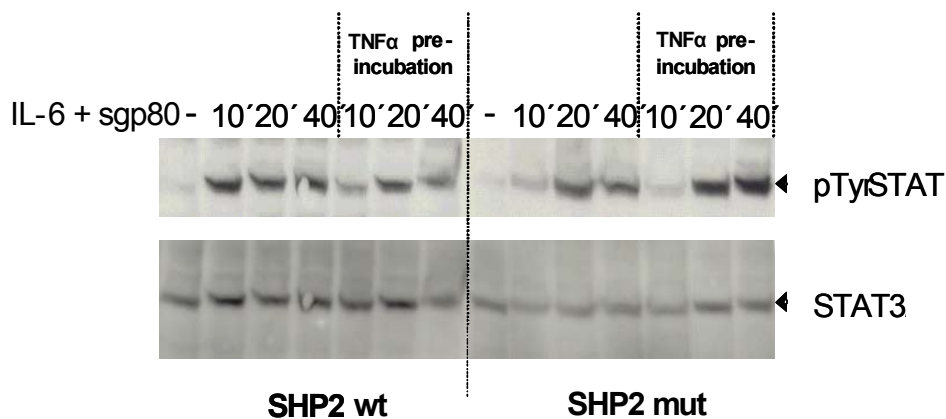
Den Vorbefunden entsprechend hemmt TNF auch in den SHP2-wt-Zellen die IL6/gp80 vermittelte Aktivierbarkeit von STAT3. In den SHP2-Wildtyp-Zellen wird durch IL-6 und gp80 wie zu erwarten eine deutliche STAT3-Aktivierbarkeit mit einem Maximum nach 20 Minuten, im Gegensatz dazu wird durch Vorinkubation mit TNF $\alpha$  nur eine geringe STAT3-Aktivierung erreicht, die über die gemessenen Zeiträume konstant bleibt. In den Zellen, die die fehlerhafte SHP2 exprimieren, kommt es durch Stimulation mit IL-6 und sgp80 zu einer weitaus stärkeren Aktivierbarkeit von STAT3 im Vergleich zu den Wildtypzellen, die auch durch Vorinkubation mit TNF $\alpha$  nicht beeinflusst wird (Abbildung 8A).

Im Gegensatz zu den Wildtypzellen wurde die durch IL-6 induzierte STAT3-Tyrosinphosphorylierung und STAT3-DNA-Bindung in den SHP2-mutierten Zellen durch Vorinkubation mit TNF $\alpha$  so gut wie nicht beeinflusst, so dass der hemmende Einfluss durch TNF $\alpha$  vollständig aufgehoben wurde (Abbildungen 8 A und 8 B). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen führte die Vorinkubation der Wildtypzellen mit TNF $\alpha$  zu einer Hemmung der gp130-abhängigen transkriptionellen Aktivität des  $\alpha_2$ -Makroglobulinpromotorgenkonstrukts, wobei der hemmende Effekt von TNF $\alpha$  nicht in den Zellen beobachtet werden konnte, die die mutierte SHP2 exprimieren (Abbildung 8 C). In diesen Zellen wird die STAT3-Aktivierung, -Phosphorylierung und -DNA-Bindung durch IL-6 bzw. Erythropoetin im Vergleich zu den Wildtypzellen sogar noch deutlich verstärkt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung der durch IL-6 induzierten STAT3-Aktivierung durch TNF $\alpha$  von einer funktionsfähigen SHP2 abhängig ist.

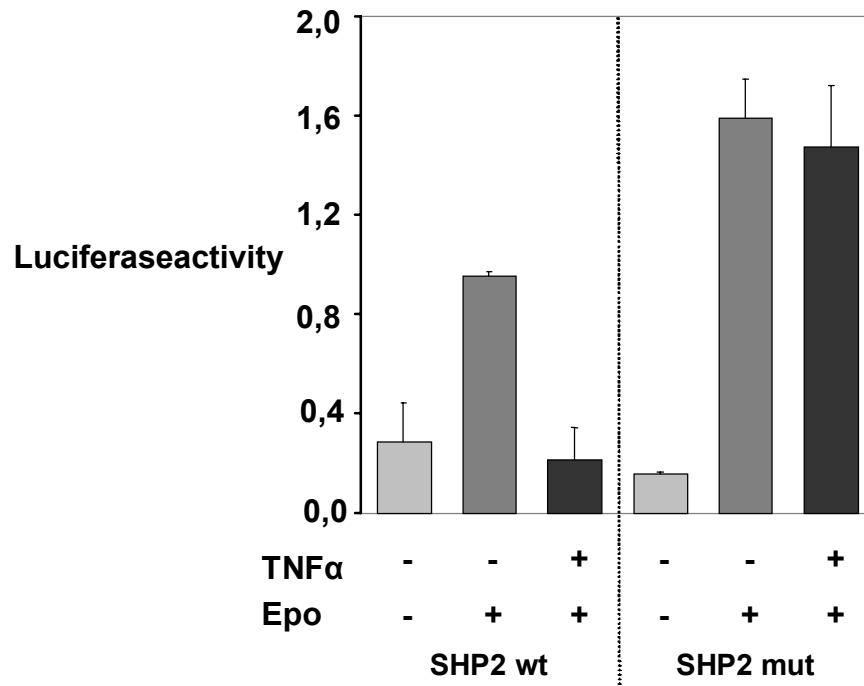
## EMSA



**Abbildung 8 A:** SHP2-Wildtyp-Zellen (SHP2 wt) und SHP2-Mutanten (SHP2 mut) wurden über 10, 20 und 40 Minuten mit TNF $\alpha$  (10 ng/ml) vorbehandelt und anschließend mit 150 U/ml IL-6 und der löslichen IL-6 Rezeptoruntereinheit gp80 (10  $\mu$ g/ml) stimuliert. Dann wurden Kernextrakte zur Untersuchung der STAT3-Aktivierbarkeit im EMSA gewonnen.



**Abbildung 8 B:** SHP2-Wildtyp-Zellen (SHP2 wt) und SHP2-Mutanten (SHP2 mut) wurden mit TNF $\alpha$  (10 ng/ml) über 40 Minuten vorinkubiert und anschließend mit IL-6 (150 U/ml) und gp80 (10  $\mu$ g/ml) über die angegebenen Zeiträume stimuliert. Zellysate wurden im Westernblot aufgetrennt. Die STAT3-Tyrosinphosphorylierung am Tyrosin 705 wurde im Immunoblot detektiert. Nach Strippen des Blots wurde eine Beladungskontrolle mit STAT3-Antikörpern durchgeführt.

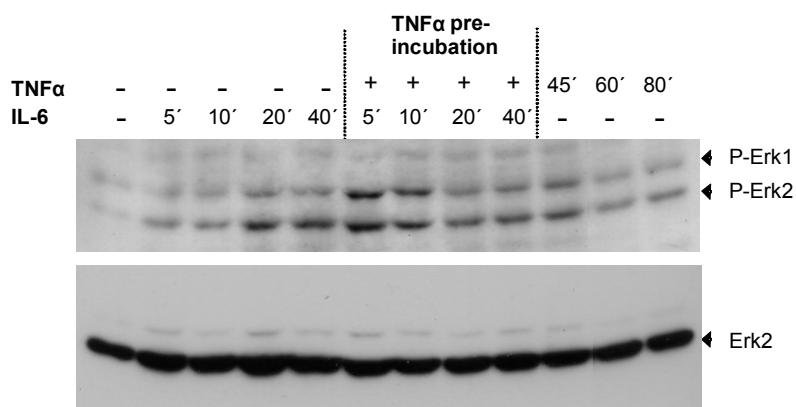


**Abbildung 8 C:** SHP2-Wildtyp-Zellen (SHP2 wt) und SHP2-Mutanten (SHP2 mut) wurden mit dem  $\alpha_2$ -Makroglobulin-Promotor und dem chimären EPO/gp130-Rezeptor EGR(YYYYYY) co-transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit TNF $\alpha$  (10 ng/ml) über 40 Minuten vorinkubiert und anschließend mit Erythropoetin (7 U/ml) für 10 Stunden stimuliert. In Zellysaten wurde die Luciferase-Aktivität als Maß für die STAT3-Promotoraktivität gemessen.

### 3.6 Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ auf die durch IL-6 hervorgerufene Phosphorylierung der $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$

Um zu klären, ob  $\text{TNF}\alpha$  die Signalvermittlung von IL-6 als Ganzes inhibiert, oder ob nur Teile des Signalweges, wie die STAT3-Phosphorylierung, blockiert werden, wurde ein weiteres „IL-6-downstream-event“ untersucht; die durch IL-6 induzierte Aktivierung und Tyrosinphosphorylierung der  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ . Dazu wurde die  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ -Phosphorylierung in RAW 264.7-Zellsaten und die DNA-Bindungsaktivität in Kernextrakten analysiert.

IL-6 führt zur Phosphorylierung der  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$  innerhalb eines Stimulationszeitraums von 5 Minuten, die Phosphorylierung steigt aber mit zunehmender Stimulationsdauer an und erreicht ein Maximum nach 20-40 Minuten. Wie in Abbildung 9 zu sehen, wird die Aktivierung der  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$  und deren Phosphorylierung durch IL-6 durch Vorinkubation mit  $\text{TNF}\alpha$  nicht gehemmt, sondern sogar eher beschleunigt und verstärkt. Dies gilt im wesentlichen für alle untersuchten Zeitpunkte, vor allem aber für die kurzen IL-6-Stimulationszeiten von 5 und 10 Minuten.



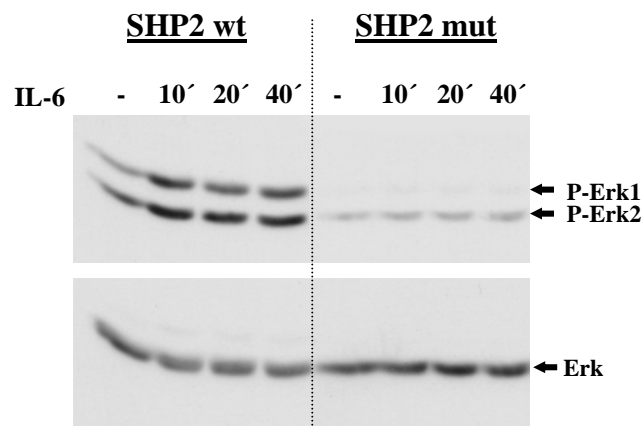
**Abbildung 9:** Nach Vorinkubation von RAW 264.7-Zellen mit  $\text{TNF}\alpha$  (10 ng/ml) über 40 Minuten wurden die Zellen mit IL-6 (200 U/ml) über die entsprechenden Zeiträume stimuliert. Gleiche Mengen an Zellsat wurden im SDS-Page aufgetrennt und durch Immunoblot mit Phospho-ERK1/2 und ERK-Antikörpern detektiert.

Bekannt war bereits, dass die SHP2 als Adapterprotein fungiert, welches die Signaltransduktion über gp130 mit dem  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ -Pathway verbindet [136].

Um die Bedeutung der SHP2 für die  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ -Phosphorylierung für die IL-6-Signalvermittlung aufzuzeigen, wurden MEF-Zellen und MEF-Zellen, denen das Exon 3 der SHP2 fehlt, mit IL-6 stimuliert. Die Zellsate dieser beiden Zelllinien wurden dann auf die  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ -Phosphorylierung hin untersucht (Abbildung 10).



Unter Stimulation mit IL-6 kommt es in den Wildtyp-MEF-Zellen schon nach 10 Minuten zur Phosphorylierung der ERK<sup>MAPK</sup>. Diese bleibt auf konstant hohem Niveau über einen Stimulationszeitraum von 40 Minuten. In den MEF Zellen, die die funktionslose SHP2 exprimieren, existiert basal ein sehr niedriges Niveau an phosphorylierten ERK<sup>MAPK</sup>, das sich auch durch Stimulation mit IL-6 nicht anheben lässt. Dies zeigt, dass zur ERK<sup>MAPK</sup>-Phosphorylierung durch IL-6 die Tyrosinphosphatase SHP2 essentiell ist.



**Abbildung 10:** SHP2-Wildtyp-Zellen (SHP2 wt) und SHP2-Mutanten (SHP2 mut) wurden über Zeiträume von 10-40 Minuten mit IL-6 (200 U/ml) stimuliert. Die Zellysate wurden im 8%-igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Blotten wurde die Membran in 5%-igem BSA über 45 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Die Detektion erfolgte mit dem Phospho-p42/p44<sup>MAPK</sup>-Antikörper (Cell Signaling) in einer Konzentration von 1:2000. Nach dem Strippen des Blots und nochmaligem Blocken mit 5%-igem BSA wurde die Beladungskontrolle mit dem p42/p44<sup>MAPK</sup>-Antikörper in einer Konzentration von 1:4000 durchgeführt.

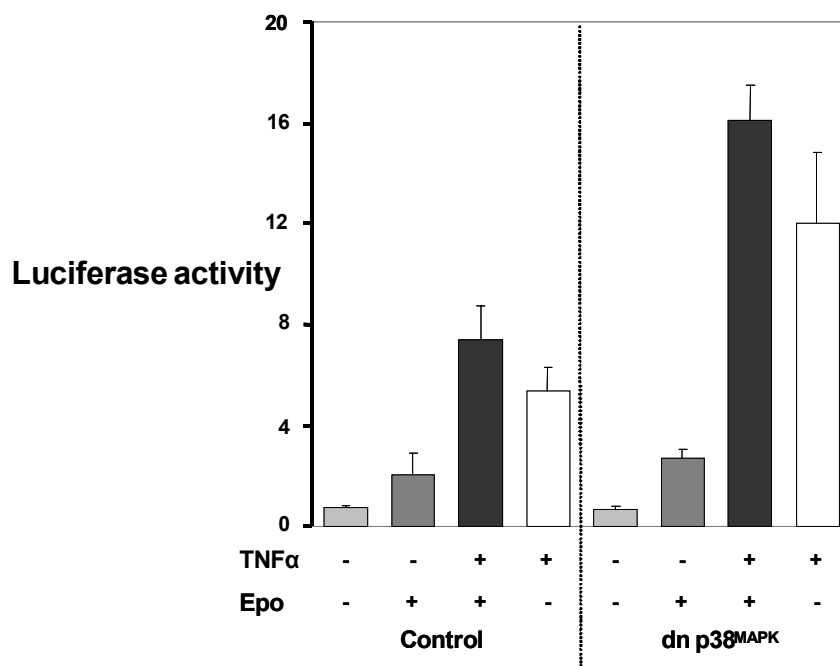
Unklar war bisher, ob die p38<sup>MAPK</sup> an der Aktivierung der ERK<sup>MAPK</sup> durch IL-6, durch TNF $\alpha$ , sowie bei IL-6-Stimulation unter vorherigem TNF $\alpha$ -Einfluss beteiligt ist.

Zur Untersuchung dieses Sachverhaltes wurden Reporteragen-Assays in NIH-3T3-Zellen durchgeführt. Zellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, das ein Fusionsprotein exprimiert, bestehend aus der Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors ELK1 (pEA-ELK1) und der Hefe-GAL4-DNA-Bindungsdomäne (Abbildung 11). ELK1 ist ein Protein, das durch die aktivierten ERK<sup>MAPK</sup> phosphoryliert wird [137]. Die Phosphorylierung der ELK1-Aktivierungsdomäne wiederum führt zur transkriptionellen Aktivierung eines Reporterplasmids, das aus einer Sequenz von fünf GAL4-Bindungselementen besteht und mit einer luciferase-kodierenden Sequenz fusioniert ist.

Die transkriptionelle Aktivierung über das ELK1-transaktivierte Fusionsprotein geschieht durch die Stimulation des co-transfizierten EPO/gp130-Chimärs mit Erythropoetin.

Kostimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  oder Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  alleine führen zu einer stärkeren Luciferase-Aktivität als alleinige Stimulation mit Erythropoetin. Dies bestätigt die Ergebnisse aus Abbildung 9, wonach  $\text{TNF}\alpha$  die durch IL-6 hervorgerufene  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ -Aktivierung nicht beeinträchtigt, sondern eher verstärkt.

Die Transfektion der mutierten, dominant negativen  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  ( $\text{p38 dn}$ ) bewirkt eine signifikante Erhöhung der transkriptionellen Aktivierung von ELK1 nach Kostimulation mit EPO und  $\text{TNF}\alpha$  oder  $\text{TNF}\alpha$  alleine, wobei die basale und durch EPO hervorgerufene Aktivierung nur leicht beeinflusst werden.



**Abbildung 11:** Zellen wurden kotransfiziert mit dem chimären EPO/gp130-Rezeptor (EGR(YYYYYY)), dem pFR-Luc-Plasmid, pFA2 ELK1-Plasmid und entweder dem kRSPA-Leervektor oder der dominant negativen Mutante der  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  ( $\text{p38dn}$ ). Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit  $\text{TNF}\alpha$  (10 ng/ml) über 40 Minuten vorinkubiert und anschließend über einen Zeitraum von 10 Stunden mit Erythropoetin (7 U/ml) stimuliert. Die gemessene Luciferaseaktivität in den Zellysaten wurde bestimmt und mit der Renilla-Luciferaseaktivität verrechnet.

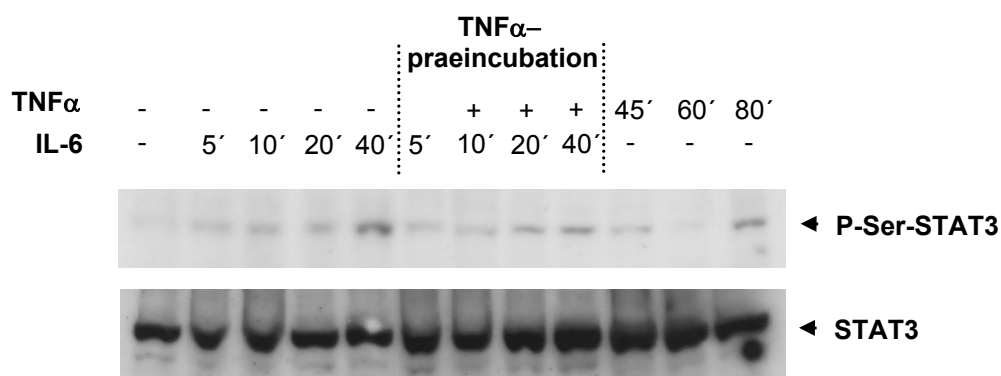
### 3.7 Beeinflussung der STAT3-Serinphosphorylierung durch IL-6 und Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ auf diese Phosphorylierung

Die Tyrosinphosphorylierung von STAT-Molekülen reguliert deren Dimerisierung und ist eine essentielle Voraussetzung für die JAK-STAT-Signalvermittlung. Daneben gibt es jedoch bei allen STATs ausser STAT2 und STAT6 eine weitere Stelle, die an einem Serin phosphoryliert wird. Für STAT3 ist es das Serin 727 [138]. Die Bedeutung der Serinphosphorylierung für die JAK-STAT-Signavermittlung wird bis heute kontrovers diskutiert. In der überwiegenden Mehrzahl der Publikationen wird davon ausgegangen, dass

die Serinphosphorylierung von STAT3 zu einer verstärkten Aktivität von Transkriptionsfaktoren nach Zytokinstimulation [116, 117] und einer gesteigerten STAT3-DNA-Bindung [118-120] führt, wobei diese Befunde vom zellulären Kontext abhängig sind. So gibt es auch Arbeiten, die eine verminderte transkriptionelle Antwort unter einer Serinphosphorylierung von STAT3 beschreiben [121-124]. Die Serinphosphorylierung von STAT3 kann abhängig vom Stimulus durch mehrere Signalwege erfolgen. Die Phosphorylierung allein durch IL-6 geschieht durch unterschiedliche Signalwege. Der dominierende verläuft über einen H7-sensitiven Signalweg, bei dem sowohl ERK<sup>MAPK</sup>, p38<sup>MAPK</sup>, JNK<sup>MAPK</sup> und die PKC $\delta$  keine Rolle spielen [139]. Der zweite Signalweg, über den IL-6 zu einer Serinphosphorylierung von STAT3 führt, wird durch die Aktivierung von Ras/Raf/MEK und der ERK<sup>MAPK</sup> hervorgerufen [136, 139]. Die Serinphosphorylierung von STAT3 durch TNF $\alpha$  soll über die JNK<sup>MAPK</sup> verlaufen und unabhängig von der p38<sup>MAPK</sup> und den ERK<sup>MAPK</sup> sein [123].

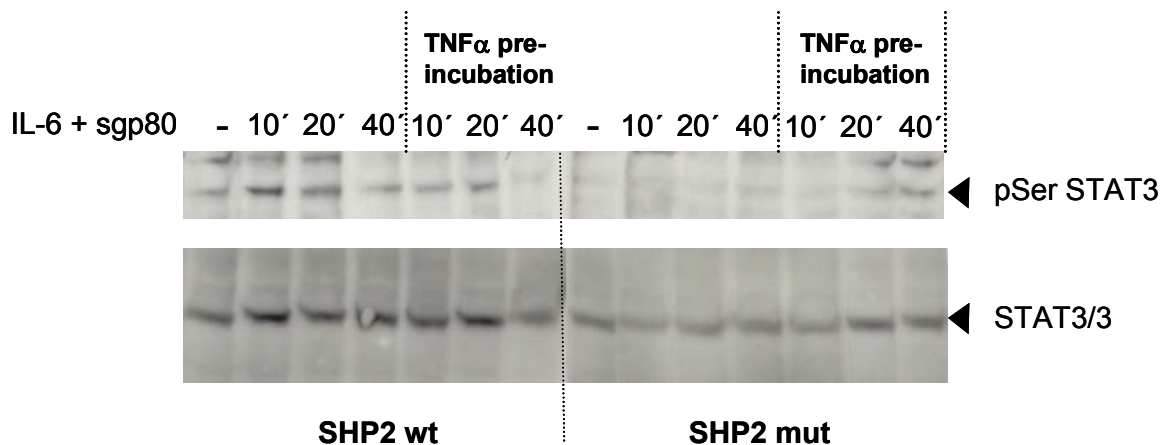
Das Ausmass der STAT3-Serinphosphorylierung durch IL-6 und TNF $\alpha$  + IL-6 wurde in RAW 264.7-Zellysaten mit Hilfe von Western-Blots untersucht (Abbildung 12 A).

IL-6 führt demnach zu einer Serinphosphorylierung von STAT3, die mit zunehmender Stimulationsdauer stärker wird und in den Versuchen bei 40 Minuten ihr Maximum erreicht. Durch Vorinkubation mit TNF $\alpha$  kommt es zu einer abgeschwächten Serinphosphorylierung von STAT3 durch IL-6-Stimulation, vor allem nach 40 Minuten. TNF $\alpha$  alleine führt ebenfalls zu einer, wenn auch schwachen Serinphosphorylierung von STAT3. Interessanterweise scheint TNF $\alpha$  die durch IL-6 hervorgerufene Serinphosphorylierung zu vermindern, obwohl TNF $\alpha$  selbst ja auch das Serin 727 von STAT3 phosphoryliert.



**Abbildung 12 A:** Raw 264.7-Zellen wurden zum einen über 5,10, 20 und 40 Minuten mit IL-6 (150 U/ml) stimuliert, zum anderen wurden Zellen vor der Stimulation mit IL-6 über 40 Minuten mit TNF $\alpha$  (10 ng/ml) vorinkubiert. Die hergestellten Zellysate wurden mit dem Phospho-Serin-STAT3-Antikörper (New-England Biolabs) in einer Verdünnung von 1:2000 detektiert. Nach dem Strippen wurde die Membran mit dem STAT3-Antikörper (New-England Biolabs) in einer Verdünnung von 1:2000 detektiert.

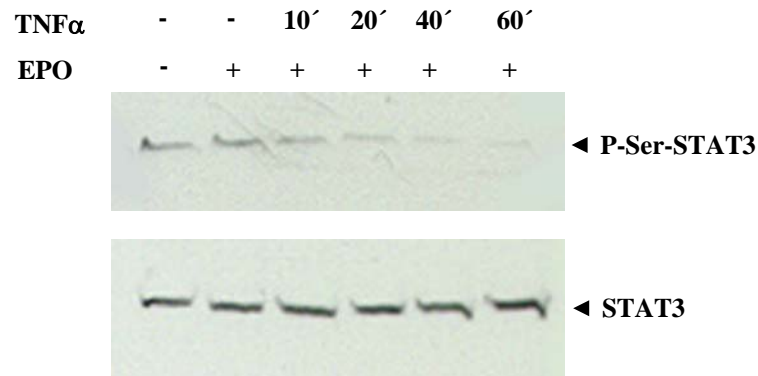
Zur Darstellung der Bedeutung der SHP2 an der Serinphosphorylierung von STAT3 wurde die Serinphosphorylierung durch IL-6 und TNF $\alpha$  + IL-6 in mausembryonalen Fibroblasten untersucht, die eine funktionslose SHP2-Mutante exprimieren. Die STAT3-Serinphosphorylierung im Zellysat wurde anschliessend mit Wildtyp-Fibroblasten verglichen (Abbildung 12 B).



**Abbildung 12 B:** MEF Zellen und MEF-SHP2<sup>-/-</sup>-Zellen wurden über 10, 20 und 40 Minuten mit IL-6 (150 U/ml) und sgp80 (10  $\mu$ g/ml) stimuliert, oder zusätzlich zur Stimulation mit TNF $\alpha$  (10 ng/ml) über 40 Minuten vorinkubiert. Es wurden Zellysatebgegewonnen und im Westernblot aufgetrennt. Die Proteine wurden mit dem Phospho-Serin-STAT3-Antikörper (New-England Biolabs) in einer Verdünnung von 1:2000 detektiert. Nach dem Strippen wurde die Membran mit dem STAT3-Antikörper (New-England Biolabs) in einer Verdünnung von 1:2000 detektiert.

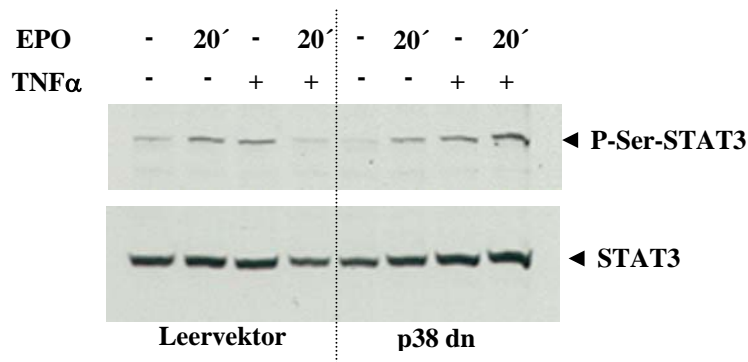
Wie in den RAW 264.7-Zellen wird in den MEF-Wildtypzellen nach Stimulation mit IL-6 STAT3 serinphosphoryliert, wobei das Maximum jedoch schon nach 10 bis 20 Minuten erreicht wird. Vorstimulation mit TNF $\alpha$  führt zu einer Abschwächung der Phosphorylierung. In den MEF-Zellen, die die SHP2-Mutante exprimieren, kommt es kaum zu einer Serinphosphorylierung durch IL-6, was darauf schliessen lässt, dass die SHP2 für die Serinphosphorylierung von STAT3 durch IL-6 von wesentlicher Bedeutung ist. Durch Vorinkubation mit TNF $\alpha$  und nachfolgender Stimulation mit IL-6 ist nach 20 und 40 Minuten eine diskrete Serinphosphorylierung erkennbar.

Zur genaueren Untersuchung dieses interessanten Befundes wurde eine Zeitreihe erstellt, wobei in mit EPO-gp130-Konstrukten transfizierten NIH-Zellen die durch EPO induzierte Serinphosphorylierung in Abhängigkeit von der Zeitdauer der Vorstimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  untersucht wurde (Abbildung 12C). Dabei zeigt sich, dass die Serinphosphorylierung mit ansteigender Zeitdauer der Vorstimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  immer weiter abnimmt und unter den unstimulierten Wert absinkt.



**Abbildung 12C:** NIH-3T3-Zellen wurden mit dem Epo/gp130-Rezeptor transfiziert. Die IL-6-Signalvermittlung wurde durch Stimulation mit EPO (0,5 U/ml) über einen Zeitraum von 20 Minuten induziert. Zuvor erfolgte eine Vorinkubation der Zellen mit  $\text{TNF}\alpha$  über einen Zeitraum von 10, 20, 40 oder 60 Minuten. Die Zellysate wurden über ein SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblottet, mit BSA geblockt und mit dem Phospho-Serin-STAT3-Antikörper (Cell Signaling) in einer Konzentration von 1:2000 und nach dem Strippen des Blots mit dem STAT3-Antikörper (Cell Signaling) in einer Konzentration von 1:2000 detektiert.

Es ist bereits bekannt, dass die Induktion der STAT3-Serinphosphorylierung durch  $\text{TNF}\alpha$  nicht über die  $\text{p}38^{\text{MAPK}}$ , sondern  $\text{JNK}^{\text{MAPK}}$ -abhängig erfolgt. Möglicherweise führt die Aktivierung der  $\text{p}38^{\text{MAPK}}$  trotzdem zu einer Beeinflussung der Serinphosphorylierung von STAT3. Dies wurde in Zellysaten von NIH-Zellen über eine Überexpression einer dominant negativen  $\text{p}38^{\text{MAPK}}$  untersucht.



**Abbildung 12D:** MEF-Zellen wurden mit dem EPO/gp130-Rezeptor und zusätzlich mit der dominant negativen p38<sup>MAPK</sup> oder dem pcDNA3-Leervektor transfiziert. Die IL-6-Signalvermittlung wurde durch Stimulation mit EPO (1 U/ml) über einen Zeitraum von 20 Minuten induziert. Zuvor erfolgte eine Vorinkubation der Zellen mit TNF $\alpha$  (10 ng/ml) für 20 Minuten. Die Zellysate wurden über ein SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblottet, mit BSA geblockt und mit dem Phospho-Serin-STAT3-Antikörper (Cell Signaling) in einer Konzentration von 1:2000 und nach dem Strippen und erneuten Blocken des Blots mit BSA mit dem STAT3-Antikörper (Cell Signaling) in einer Konzentration von 1:2000 detektiert.

In den mit dem Leervektor transfizierten Zellen kommt es durch Aktivierung des IL-6- oder des TNF $\alpha$ -Signalweges zur Serinphosphorylierung von STAT3. Die Kombination beider Zytokine führt jedoch zur Abschwächung der Serinphosphorylierung unterhalb des Basalwertes in unstimulierten Zellen. In den mit der dominant negativen p38<sup>MAPK</sup> transfizierten Zellen kommt es nach Aktivierung des IL-6- und des TNF $\alpha$ -Signalweges alleine ebenfalls zu einer Serinphosphorylierung von STAT3. Dies weist darauf hin, dass die Serinphosphorylierung durch IL-6 und durch TNF $\alpha$  unabhängig von der p38<sup>MAPK</sup> erfolgt.

Erstaunlicherweise kommt es unter Kombination von IL-6 und TNF $\alpha$  im Gegensatz zu den mit dem Leervektor transfizierten Zellen zu einer starken Serinphosphorylierung von STAT3, die die Serinphosphorylierung, welche durch Stimulation mit IL-6 oder TNF $\alpha$  alleine ausgelöst wird, noch übersteigt.

Spekuliert werden kann darüber, ob die die p38<sup>MAPK</sup> die Serinphosphorylierung von STAT3 verhindert oder bestimmte Phosphatasen aktiviert, die das Serin 727 von STAT3 dephosphorylieren. Ein wichtiger Kandidat dafür ist die MAP-Kinasen-Phosphatase 1 (MKP1). Die Beeinflussung der MAPK-Phosphatase durch die p38<sup>MAPK</sup> sollte in Zukunft noch weiter abgeklärt werden.

### 3.8 Generierung von p38<sup>MAPK</sup>-Fusionsproteinen

Die Vorarbeiten zeigen, dass die p38<sup>MAPK</sup> eine zentrale Bedeutung bei der Modulation der Signalvermittlung durch IL-6 hat. Zur genauen Evaluation der Funktion der p38<sup>MAPK</sup> wurden Fusionsproteine hergestellt, mit denen in weiteren Experimenten die genaue Bedeutung der p38<sup>MAPK</sup> genauer untersucht werden soll und mit deren Hilfe auch die genaue Aufarbeitung der subzellulären Lokalisation der Interaktion der p38<sup>MAPK</sup> mit anderen Proteinen genauer untersucht werden kann.

### 3.8.1 p38<sup>MAPK</sup>-YFP

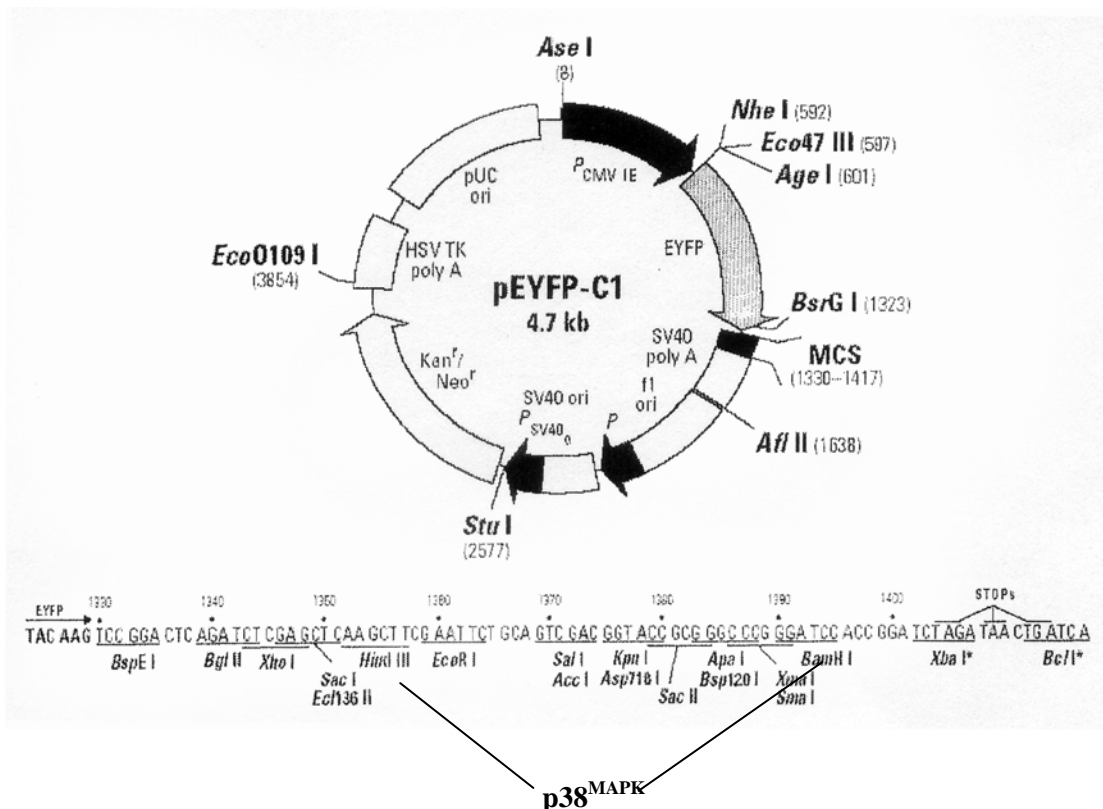
In Vorbereitung zu diesen Arbeiten war methodischer Bestandteil dieser Arbeit die Generierung eines p38<sup>MAPK</sup>-Fusionsproteins. Hierzu wurde das p38<sup>MAPK</sup>-Yellow fluoresceing protein generiert. Das Konstrukt enthält die murine p38<sup>MAPK</sup> und ist in den YFP-Vektor kloniert, der ein Protein exprimiert, das bei entsprechender Anregung unter dem konfokalen Laserscanningmikroskop gelb fluoresziert. Es wurde über die Schnittstellen BAMH-I und HIND III in die MCS des Vektors pEYFP-C1 kloniert.

Die murine p38<sup>MAPK</sup> stammt aus dem kRSPA-Flag-p38-Plasmid (Ursprung: J. Han, S. Ludwig). Zunächst wurde sie über angefertigte Primer mit neuen Schnittstellen durch PCR amplifiziert, so dass die amplifizierte p38<sup>MAPK</sup> über Schnittstellen für BAMH I und HIND III und kodiert für die p38<sup>MAPK</sup> ohne das im Ursprungsplasmid enthaltene Flag-Protein. Sie wurde mit folgenden Primern über eine PCR amplifiziert:

mp38-YFP- s1: 5'- CTC AAG CTT ATG TCG CAG GAG AGG CCC AC - 3'

mp38-YFP- as1: 5'- TGG ATC CCG GGA CTC CAT TTC TTC TTG GTC - 3'

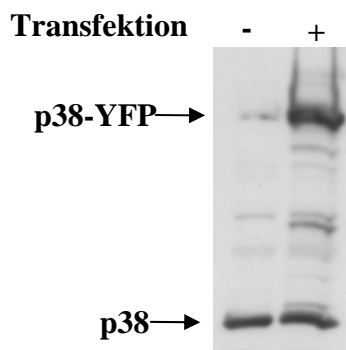
Nach Aufreinigung erfolgte die Restriktion der mp38<sup>MAPK</sup> und des pGEM-Vektors mit den Enzymen BAMH I und HIND III. Nach Klonierung der mp38<sup>MAPK</sup> in den pGEM-Vektor wurde nach Restriktion mit Eco-RI zunächst die Kontrolle der Schnittfragmente im Agarosegel durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Sequenzierung zur Kontrolle der Basenfolge angeschlossen. Nach dem Schneiden des Vektors pE-YFP-C1 mit BAMH I und HIND III wurde dieser mit der nun sequenzierten mp38<sup>MAPK</sup> ligiert. Nach Transformation und Maxipräparation schloss sich eine weitere Sequenzierung zur Kontrolle der Basenfolge an.



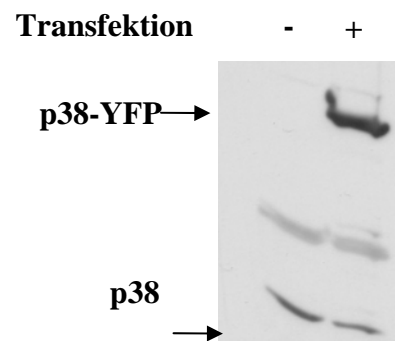
**Abbildung 13:** Klonierung der p38<sup>MAPK</sup> in die MCS des Vektors pEYFP-C1 über die Schnittstellen HIND III und BAMH I

Das hergestellte p38-YFP-Fusionsprotein wurde im folgenden nach Transfektion des Proteins in NIH-Zellen in Zellysaten getestet. Dabei wird durch den p38MAPK-Antikörper sowohl die endogene p38MAPK als auch das Fusionsprotein erkannt (Abbildung 14).

**YFP-Antikörper (Santa Cruz)**

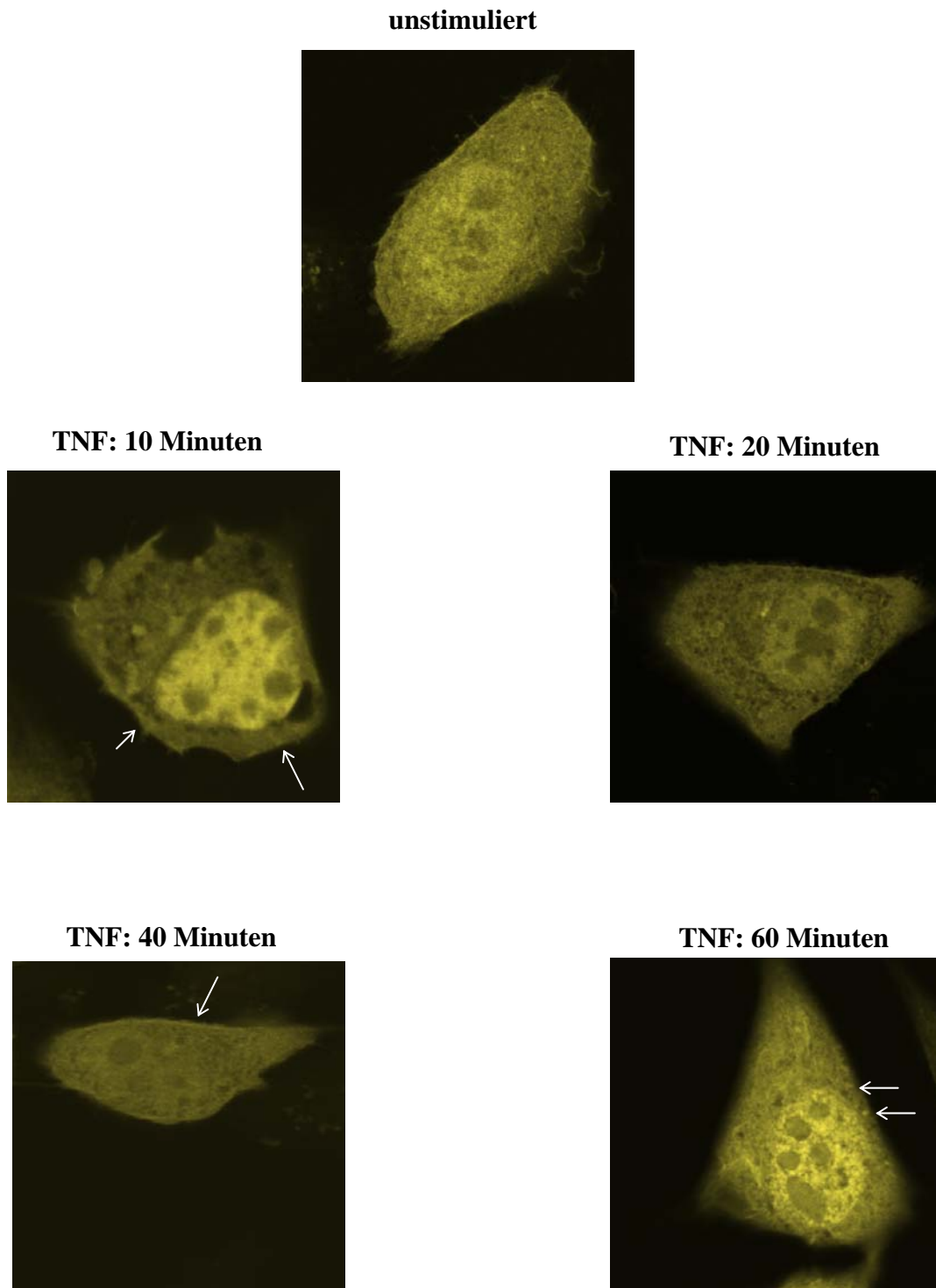


**p38-Antikörper (Santa Cruz)**



**Abbildung 14:** Das Konstrukt wurde zunächst im Westernblot über eine Detektion mit p38<sup>MAPK</sup>- und YFP-Antikörpern überprüft: NIH3T3-Zellen wurden in 60 mm-Zellkulturschalen mit dem p38-YFP-Konstrukt transfiziert. Die Zellysate der transfizierten Zellen wurden mit Zellysaten von nicht transfizierten Zellen im Western Blot aufgetrennt und mit dem monoklonalen YFP-Antikörper (Santa Cruz) in einer Verdünnung von 1:200 und dem polyklonalen p38-Antikörper (Santa Cruz) in einer Verünnung von 1:3000 detektiert.





**Abbildung 15: Verfolgung der intrazellulären Lokalisation der p38<sup>MAPK</sup> nach Stimulation mit TNF $\alpha$**

Es war bereits bekannt, dass die p38<sup>MAPK</sup> nach Stimulation mit TNF $\alpha$  eine Wanderung in den Zellkern vollzieht. Um die intrazelluläre Wanderung der p38<sup>MAPK</sup> nachzuvollziehen, wurden NiH-3T3-Zellen mit dem p38-YFP-Konstrukt auf Deckgläser transfiziert, mit TNF $\alpha$  (10ng/ml) über 10, 20, 40 und 60 Minuten stimuliert und nach dem Waschen mit Paraformaldehyd fixiert, um anschliessend in Vectashield-Medium auf Objektträgern konserviert zu werden und unter dem konfokalen LSM analysiert zu werden.

Die Aufnahmen zeigen die Verteilung des fluoreszierenden p38-YFP-Konstruktes in NIH-3T3-Zellen, abhängig von unterschiedlichen Stimulationszeiten mit  $\text{TNF}\alpha$ . In unstimulierten Zellen zeigt sich eine relativ gleichmässige Verteilung des Konstruktes, wobei sich vor allem nach 10 Minuten, aber auch nach 60 Minuten das p38-YFP-Konstrukt im Zellkern anreichert.

Dies ist übereinstimmend mit der Literaturangaben, wonach die p38MAPK nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  eine Translokation in den Zellkern vollzieht.

Auffällig ist weiterhin, dass die Verteilung des p38-YFP-Konstruktes im Zytoplasma nicht gleichmässig ist, sondern dass eine verstärkte Anreicherung des Konstruktes im Bereich der Zellmembran zu finden ist. Dabei findet man auch häufig helle Spots.

Basierend auf diesem Konstrukt wird in Folgearbeiten mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop nach Klonierung eines fluoreszierenden gp130-Moleküls die Interaktion zwischen der p38<sup>MAPK</sup> mit anderen Proteinen sowie mit gp130 genauer untersucht werden. Ebenso könnte die Interaktion zwischen der Tyrosinphosphatase SHP2 und gp130 auf diese Weise in vivo untersucht werden.

### 3.8.2 p38-pGEX (p38-GST-Konstrukt)

Desweiteren wurde ein Fusionprotein zwischen der p38<sup>MAPK</sup> und dem GST-Protein generiert. Das Konstrukt enthält die murine p38<sup>MAPK</sup> und wurde über die Schnittstellen BAMH-I und XHO-I in die MCS des Vektors pGEX kloniert.

Die murine p38<sup>MAPK</sup> stammt aus dem zuvor hergestellten und oben beschriebenen p38-YFP-Konstrukt. Die Restriktion des p38-YFP-Konstruktes sowie des pE-GEX-Vektors wurde mit den Enzymen BAMH I und XHO I durchgeführt. Nach Ligation und Transformation in Top 10-Zellen erfolgte sowohl eine Kontrolle der DNA-Fragmente nach Restriktion mit BAMH I und XHO I im Agarosegel, sowie eine Kontrolle der Basenfolge durch Sequenzierung des Konstruktes. Eine Auftrennung des Proteins im Western Blot ist bisher nicht erfolgt aufgrund des problematischen Lyseverfahrens der transfizierten Bakterien.

## 4 Diskussion

---

Die Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung molekularer Mechanismen, die für die Beeinflussung des IL-6-Signalweges durch  $\text{TNF}\alpha$  von maßgeblicher Bedeutung sind.

Vorhergehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten belegen, dass proinflammatorische Mediatoren wie  $\text{TNF}\alpha$  und LPS in Makrophagen, nicht aber in Hepatozyten die Expression von SOCS3 induzieren und die IL-6-induzierte Aktivierung von STAT3 hemmen [1]. Inhibitorstudien legen hierbei nahe, dass der Aktivierung der  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  sowohl für die  $\text{TNF}\alpha$ /LPS-bedingte Expression von SOCS3 als auch für die Hemmung der IL-6-vermittelten Aktivierung von STAT3 durch  $\text{TNF}\alpha$  bzw. LPS eine relevante Bedeutung zukommt [1]. Diese Befunde führten zu der Annahme, dass  $\text{TNF}\alpha$  bzw. LPS  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$ -abhängig die Expression von SOCS3-Protein induzieren und hierüber die IL-6-abhängige Aktivierung von STAT3 hemmen. Die Befunde der vorliegenden Arbeit untermauern die bisher nur auf Inhibitorstudien gestützte Annahme, dass die Aktivierung der  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  eine wesentliche Bedeutung für den inhibitorischen Einfluss von  $\text{TNF}\alpha$  auf die gp130 vermittelte Aktivierung von STAT3 hat (Versuch 3.2). Darüber hinaus belegen die hier dargelegten Untersuchungen, dass sowohl das Tyrosinmotiv 759 der signalvermittelnden Rezeptoruntereinheit gp130 des IL-6-Rezeptorkomplexes, als auch eine funktionsfähige Tyrosinphosphatase SHP2 relevant für die Hemmung der Aktivierung von STAT3 durch  $\text{TNF}\alpha$  sind (Versuche 3.2 und 3.4). Auf der anderen Seite lassen die Ergebnisse annehmen, dass  $\text{TNF}\alpha$  zwar die STAT3-Aktivierung hemmt (Versuch 3.1-3.2), die durch IL-6 induzierte  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ -Aktivierung aber noch verstärkt, wobei die Aktivierung unabhängig von einer aktivierten  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  erfolgt (Versuch 3.6).

Ferner fand sich, dass für die Induktion der Expression von SOCS3 durch  $\text{TNF}\alpha$  die Aktivierung der  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  wesentlich ist [1]. Vor diesem Hintergrund wurde angenommen, dass die  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$ -abhängige Induktion der SOCS3-Expression durch  $\text{TNF}\alpha$  und die Hemmung der STAT3-Aktivierung durch  $\text{TNF}\alpha$  funktionell miteinander verbunden sind. Die vorliegende Zeitkinetik (Abbildung 4B) zeigt jedoch, dass der inhibitorische Effekt von  $\text{TNF}\alpha$  auf die gp130-induzierte Aktivierung von STAT3 bereits nach 10 Minuten Vorinkubation mit  $\text{TNF}\alpha$  zu beobachten ist, so dass hierfür ein von der de novo Proteinsynthese abhängiger Schritt unwahrscheinlich ist [140]. Die Induktion der SOCS3-Expression kommt allenfalls für längerfristige Effekte von  $\text{TNF}\alpha$  auf die STAT3-abhängige Signalvermittlung in Frage. Es konnte in dem Zusammenhang gezeigt werden, dass die Hemmung der IL-6 induzierten STAT3-Aktivierung durch IL-1 $\beta$  innerhalb kurzer Zeit geschieht und auch unabhängig von

einer de novo Genexpression und Proteinsynthese ist und auch auftritt, wenn die Expression von SOCS3 blockiert wird, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen ungeklärt sind [126, 132]. Vor diesem Hintergrund konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass eine Hemmung der Phosphorylierung, DNA-Bindung und Aktivierung von STAT3 durch  $\text{TNF}\alpha$  abhängig ist von einer funktionsfähigen SHP2 und einem funktionstüchtigen Tyrosin 759 des gp130-Rezeptors (Versuch 3.2-3.4).

Dieses wird weiterhin durch die Beobachtung gestützt, dass  $\text{TNF}\alpha$  eine direkte Interaktion zwischen  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  und gp130 induziert (s. Ausblick). Hiervon unberührt bleibt die nach wie vor offene Frage, welche Rolle der SOCS3-Expression für die Hemmung der gp130-induzierten STAT3-Aktivierung zukommt.

Kürzlich wurde gezeigt, dass die beiden Moleküle SHP2 und SOCS3, obwohl sie beide an die gleiche Stelle des gp130-Moleküls binden, ihre hemmende Wirkung unabhängig voneinander ausüben [140]. SOCS3 bleibt über einen längeren Zeitraum detektierbar als die SHP2 und soll eher für die längerfristige Hemmung entscheidend sein [140], während die SHP2 eine bedeutende Rolle für die frühe Hemmung des IL-6-Signals besitzen soll. Im Unterschied zu SOCS3 führt die Rekrutierung der SHP2 durch IL-6 und  $\text{TNF}\alpha$  an gp130 zu einer Aktivierung der  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$  (Versuch 3.6). Die SHP2 fungiert dabei als Adapterprotein und verbindet die gp130-Signalvermittlung mit der Ras/Raf/MEK/ $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ -Kaskade, wobei die Stimulation von Zellen mit beiden Zytokinen diese Signalkaskade noch verstärkt.

Im Rahmen der Modulation des IL-6-Signalweges durch  $\text{TNF}\alpha$  kann man die SHP2 als molekularen Schalter betrachten, der zum einen die Signaltransduktion über die STAT-Faktoren hemmt und andererseits den Signalweg über die  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ , die Bedeutung für die Proliferation und Zellteilung besitzen, noch verstärkt. Die Verstärkung der  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ -Aktivierung durch  $\text{TNF}\alpha$  erfolgt jedoch nicht über Aktivierung der  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$ . Die aktivierte  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  scheint die  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ -Aktivierung trotzdem zu beeinflussen (Versuch 3.6). Demnach scheint die Aktivierung der  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  die Aktivierung der  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$  zu hemmen, wohingegen die  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  keinen Einfluss auf die durch IL-6 induzierte  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ -Aktivierung und die Effekte von  $\text{TNF}\alpha$  auf diese Aktivierung zu haben scheint. Bekannt ist bereits, dass die  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  an der stressinduzierten Expression von MAPK-Phosphatasen beteiligt ist, die der Aktivierung von ERK-Typ-MAPK entgegenwirken [141-143]. Möglicherweise verhindert eine  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$ -abhängige Aktivierung der MAPK-Phosphatasen eine überschüssige Aktivierung der  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ .

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass  $\text{TNF}\alpha$  zu einer Imbalance der STAT- und ERK-Signalvermittlung führt. Interessanterweise führt das Überwiegen der STAT- oder ERK<sup>MAPK</sup>-Signalvermittlung im Tiermodell zur Entstehung unterschiedlicher Krankheitsbilder. Alle Mäuse mit einer Mutation des Tyrosin 759 des gp130-Rezeptors, bei denen die Tyrosinphosphatase SHP2 nicht mehr binden kann und die ERK<sup>MAPK</sup> über gp130 nicht mehr aktiviert werden können, wobei die Genexpression der STAT3-regulierten Gene jedoch verstärkt abläuft, entwickeln innerhalb von wenigen Monaten Magenkarzinome der Antrumregion, die auch in Abwesenheit von *Helicobacter Pylori* entstehen, einem Bakterium, das mit der Entstehung eines Magenkarzinoms assoziiert ist [23, 144].

Mäuse, bei denen wegen einer Mutation der STAT-Bindungsstelle von gp130 die Aktivierung der STATs über gp130 nicht mehr möglich ist, entwickeln zwei unterschiedliche Krankheitsbilder, zum einen schwere Gelenkerkrankungen mit chronischer Synovitis, Knorpelmetaplasie und Knorpeldegeneration [22]. Zum anderen entsteht spontan eine ausgeprägte akute Colitis, wobei die Wundheilung bei diesen Mäusen ebenfalls stark beeinträchtigt ist [22]. Interessanterweise führt eine Mutation, bei der die IL-6-Signalvermittlung als Ganzes nicht mehr ablaufen kann, zur Entstehung einer akuten Colitis ohne Auftreten von Gelenkerkrankungen und einer abgeschwächten Akut-Phase-Reaktion [145, 146]. Tiere, bei denen das Tyrosin 759 des gp130-Rezeptors mutiert ist, was dazu führt, dass die SHP2 und SOCS3 nicht mehr binden können, sind dagegen resistent auch gegenüber Substanzen, die bei Wildtyptieren zu einer Schädigung des Darmepithel führen. In diesen Mäusen läuft der STAT-Signalweg verstärkt ab. Dies lässt darauf schließen, dass die STAT-Signalvermittlung einen protektiven Einfluss auf die Darmmukosa besitzt. Hiermit übereinstimmend entwickeln Tiere, bei denen STAT3 elektiv in Makrophagen ausgeschaltet wurde ebenfalls eine chronische Enterokolitis [147]

Wie in der vorliegenden Arbeit belegt, erzeugt die Interaktion von  $\text{TNF}\alpha$  mit IL-6 genau die beschriebene Situation:  $\text{TNF}\alpha$  hemmt die Signalvermittlung über JAK-STAT und verstärkt die Aktivierung der ERK<sup>MAPK</sup>. Es gibt wesentlichen Anhalt zu der Vermutung, dass beide Signalwege eine zelluläre Homöostase durch eine Balance von positiven und negativen Mechanismen innerhalb eines dynamischen Systems, wie beim Immunsystem, gewährleisten und dass ein Ungleichgewicht innerhalb der STAT- und ERK<sup>MAPK</sup>-Signalvermittlung auch beim Menschen zu ähnlichen Krankheitsbildern führt. Bei der Rheumatoiden Arthritis werden hohe Serumspiegel an  $\text{TNF}\alpha$  beobachtet. Die Erkrankung wird beim Menschen bisher erfolgreich durch eine anti- $\text{TNF}\alpha$ -Therapie behandelt. Die Hemmung zusätzlich der IL-6-Signalvermittlung war bisher weniger erfolgreich. Vielleicht

wird es schon in naher Zukunft gelingen, mit Hilfe des immer besser werdenden Verständnisses über die molekularen Mechanismen der intrazellulären IL-6- und TNF $\alpha$ -Signalvermittlung, sowohl bei der Rheumatoiden Arthritis, als auch bei den autoimmun verursachten Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa noch wirkungsvollere Therapien zu entwickeln. Spekuliert werden kann über eine kombinierte Hemmung der IL-6- und TNF-Signalvermittlung. Ein wichtiges Target könnte dabei auch die p38<sup>MAPK</sup> sein.

Als weiteres Motiv, das über eine Phosphorylierung modulierend in den JAK-STAT-Signalweg eingreift, gilt ein Serinrest, der bei allen STAT-Molekülen, bis auf STAT2 und STAT6 vorhanden ist. Im Falle von STAT3 soll die Phosphorylierung des Serin 727 zu einer verstärkten Aktivität des Transkriptionsfaktors nach Zytokinstimulation [116, 117] und einer gesteigerten STAT3-DNA-Bindung [118-120] führen, wobei die Translokation des STAT3-Moleküls in den Kern nicht über die Serinphosphorylierung beeinflusst wird [148]. Regulatorische Mechanismen der Serinphosphorylierung sind in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung gewesen und in ihrer gesamten Komplexität noch lange nicht verstanden. Das Serin 727 des STAT3-Moleküls kann durch vielfältige Stimuli phosphoryliert werden. Dazu gehören unter anderem EGF, PDGF, Insulin, OSM, LIF, IL-2, UV-Licht, Anisomycin, Hyperosmolarität, aber auch TNF $\alpha$  und IL-6 [148]. Es wurden abhängig vom Stimulus unterschiedliche Signalwege identifiziert, über die es zur Phosphorylierung kommt. Die Serinphosphorylierung durch TNF $\alpha$  ist JNK<sup>MAPK</sup>-abhängig und unabhängig von den durch TNF $\alpha$  ebenfalls aktivierten ERK<sup>MAPK</sup> und der p38<sup>MAPK</sup> [123]. Für IL-6 existieren mindestens zwei unterschiedliche Signalwege, die zu einer Serinphosphorylierung von STAT3 führen. Ein Signalweg, der durch den Serin/Threoninkinase-Inhibitor H7 und die Proteinkinase  $\Delta$  gehemmt werden kann, wird dabei schon durch sehr geringe IL-6-Konzentrationen aktiviert [122, 139]. Der zweite Signalweg, der durch den Kinasen-Inhibitor PD98059 hemmbar ist, wird erst durch relativ hohe Konzentrationen an IL-6 aktiviert und verläuft über die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade [136, 139]. Für beide Signalwege wurden die Motive an der IL-6-Rezeptoruntereinheit gp130 identifiziert, die zur Serinphosphorylierung von STAT3 benötigt werden. Für den H7-beziehungsweise den PKC $\Delta$ -sensitiven Signalweg ist es ein YXXQ-Motiv und für den durch PD98059 hemmbaren Signalweg ist ein YSTV-Motiv identifiziert worden [122, 139].

Wie in den Untersuchungen gezeigt, verringert TNF $\alpha$  die durch IL-6 induzierte Serinphosphorylierung von STAT3, obwohl TNF $\alpha$  selbst zu einer Serinphosphorylierung von STAT3 führt (Versuch 3.7). Zwar kommt es durch TNF $\alpha$  zu einer Verstärkung der durch IL-6 induzierten ERK<sup>MAPK</sup>-Aktivierung (Versuch 3.7), was demnach auch zu einer gesteigerten

Serinphosphorylierung über den durch PD98059 hemmbaren Signalweg führen sollte. Wieso es jedoch zu einer verminderten Serinphosphorylierung durch kombinierte Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 kommt, wird in Zukunft noch geklärt werden müssen.

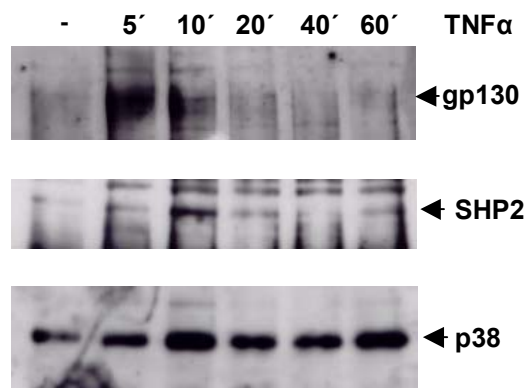
Die vorliegenden Untersuchungen legen nahe, dass die Tyrosinphosphatase SHP2 für die durch IL-6 induzierte STAT3-Serinphosphorylierung von Bedeutung ist (Versuch 3.7). SHP2 gilt als Adapterprotein, das in der IL-6-Signalvermittlung eine Brücke über die Proteine RAS/RAF/MEK zur  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ -Aktivierung herstellt. Die Ergebnisse wären demnach im Einklang mit den Befunden, dass es über die  $\text{ERK}^{\text{MAPK}}$ -Aktivierung zu einer Serinphosphorylierung von STAT3 kommt. Übereinstimmend damit sind auch die Befunde zu sehen, dass IL-6 eine Serinphosphorylierung von STAT3 bewirkt über einen durch PD98059 hemmbaren Signalweg, der über die Aktivierung von Ras/Raf/MEK/ERK verläuft [136, 139].

Die Zytokine  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 spielen eine grosse Rolle auch für verschiedene andere entzündliche Erkrankungen, wie beispielsweise für die Sepsis, für die bisher noch keine zufriedenstellenden Therapiemethoden entwickelt werden konnten. Es gab in der Vergangenheit zwar etliche Therapieversuche, über die Blockierung des  $\text{TNF}\alpha$ -Signalweges durch Antikörper und lösliche Rezeptoren auch den Verlauf der Sepsis günstig zu beeinflussen. Die Therapien sind aber meistens daran gescheitert, dass das Zusammenspiel der einzelnen Zytokine nicht erkannt und damit auch nicht ausreichend berücksichtigt wurde. Neuere klinische Studien zeigen, dass von einer Blockierung des  $\text{TNF}\alpha$ -Signalweges vor allen Dingen Patienten mit hohen IL-6-Serumspiegeln profitieren, wobei sich die Prognose bei Patienten mit niedrigen IL-6-Spiegeln verschlechtert [91].

Damit aus den primär in klinischen Studien und Tiermodellen gewonnenen Erkenntnissen effektive Therapien entwickelt werden können, ist es Grundvoraussetzung, die Signalvermittlung der Zytokine und deren Beeinflussung auf molekularer Ebene zu verstehen, um spezifisch bestimmte Anteile der Signaltransduktion zu modulieren.

## 5 Ausblick

Die Befunde der vorliegenden Arbeit legen eine zentrale Bedeutung der p38<sup>MAPK</sup> für die Modulation der gp130-abhängigen Signalvermittlung durch TNF $\alpha$  nahe. Ungeklärt bleibt, auf welche Weise die p38<sup>MAPK</sup> mit der Signalvermittlung durch gp130 interagiert. Arbeiten von Ahmed et al. suggerieren, dass die p38<sup>MAPK</sup> ihren Einfluss unabhängig von einer de novo Protein-Synthese möglicherweise durch eine Modifikation im membranproximalen Bereich von gp130 vermittelt [126, 132]. Es soll ein schnell wirkender Mechanismus sein, wobei das JAK-STAT-Signaling auf Rezeptorebene blockiert wird, noch vor der Tyrosinphosphorylierung von STAT3. Dieser Mechanismus ist dabei auch unabhängig vom Einfluss von SOCS3 und der SHP2 [126, 132]. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der durch IL-6 induzierten STAT3-Aktivierung auch in den Zellen erfolgt, in denen das IL-6-Signal über Rezeptoren vermittelt wird, bei denen das Tyrosin 759 mutiert ist und an die sowohl SOCS3 als auch die SHP2 nicht mehr binden können. Es wird daher zu klären sein in wie weit die p38<sup>MAPK</sup> direkten Einfluss auf die Funktionalität von gp130 hat. Eigene vorläufige Befunde legen nahe, dass es unter Stimulation mit TNF $\alpha$  zu einer direkten Interaktion der p38<sup>MAPK</sup> mit gp130 kommt.



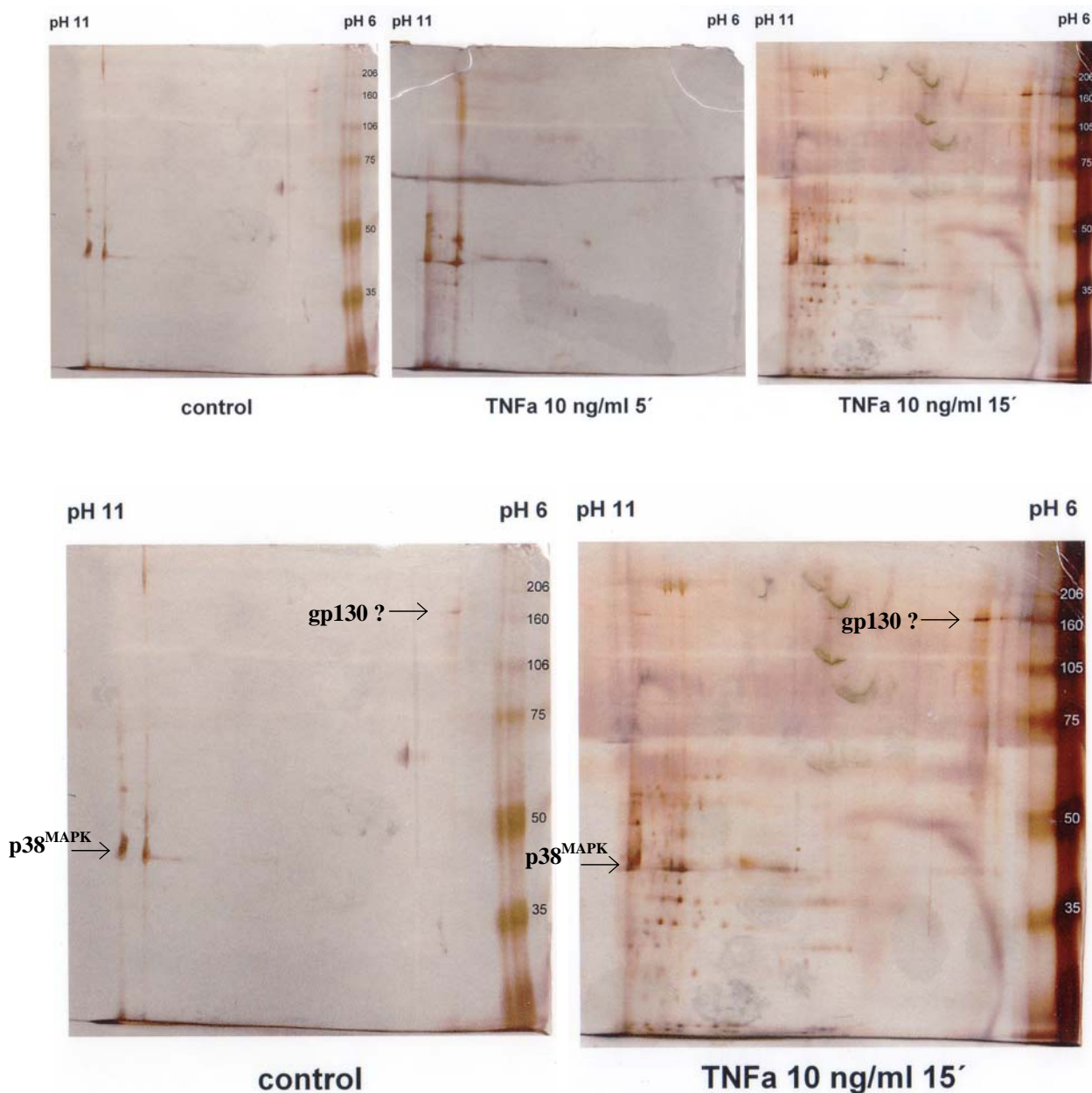
IP: p38

**Abbildung 17:** Raw 264.7-Zellen wurden über die angegebenen Zeiträume mit hTNF $\alpha$  (10 ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden in Triton-Lysispuffer lysiert und die Ko-Immünpräzipitation wurde mit 1  $\mu$ g p38<sup>MAPK</sup>-Antikörper (Stressgen), wie unter Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Anschliessend wurden die präzipitierten Proteine auf einem 7,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde in drei Teile geschnitten und mit folgenden Antikörpern inkubiert: <50 kd: p38<sup>MAPK</sup>-polyclonal (Stressgen): 1:2500; >50 - <80kd: SH-PTP2 (C18) polyclonal (Santa-Cruz Biotechnology): 1: 4000; >80kd: gp130(M20) polyclonal (Santa-Cruz Biotechnology): 1:200.



Die Ko-Immunpräzipitation zeigt eine Interaktion zwischen der  $p38^{MAPK}$  und gp130, vor allem 5-10 Minuten nach Stimulation mit  $TNF\alpha$ . Auch die SHP2 scheint mit der  $p38^{MAPK}$  zu interagieren. Möglicherweise erfolgt eine frühe Hemmung der JAK-STAT-Signalvermittlung durch  $TNF\alpha$  über die  $p38^{MAPK}$  schon auf IL-6-Rezeptorebene über eine Interaktion mit gp130.

Als weiteren Hinweis auf eine Interaktion zwischen der  $p38^{MAPK}$  und gp130 dienen Immunpräzipitationen, die über eine zweidimensionale Elektrophorese aufgetrennt wurden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden hier erste Ergebnisse dargestellt, die jedoch noch zuverlässig zu reproduzieren sind.



---

**Abbildung 21:** RAW-Zellen wurden über 15 Minuten mit TNF $\alpha$  stimuliert, dann wurden Zellysate gewonnen, wie unter Material und Methoden beschrieben. Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem p38<sup>MAPK</sup>-Antikörper (Stressgen) über Nacht bei 4°C. Die Berechnung des theoretischen isoelektrischen Punktes mithilfe der Fasta-Sequenz ergab für die p38<sup>MAPK</sup> einen IP von 9,79 und für gp130 einen IP von 5,93. Die Berechnung wurde auf der Internetseite <http://bioinformatics.org> durchgeführt.

Zukünftige Arbeiten müssen neben einer genaueren Charakterisierung der Zeit und Konzentrationsabhängigkeit hier die genaue Interaktionsseite von gp130 mit der p38<sup>MAPK</sup> identifizieren sowie ihre Relevanz für die Modulation der gp130 abhängigen Signalvermittlung.

## 6 Zusammenfassung

---

Die Arbeit befasst sich mit den molekularen Mechanismen der Beeinflussung der intrazellulären IL-6-Signalvermittlung durch TNF- $\alpha$ . Beides sind Zytokine, die bei entzündlichen Krankheiten, wie unter anderen bei der Rheumatoiden Arthritis, bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und bei der Sepsis eine entscheidende Rolle spielen. Früher wurden die Wirkungen der Zytokine häufig isoliert voneinander betrachtet. Heute weiß man jedoch, dass ein Zytokin die Signalvermittlung eines anderen Zytokins modulieren kann und ein „Ungleichgewicht“ der Zytokine, bzw. der durch sie induzierten Signalwege, ihre biologische Wirkung verändert und hierdurch eine Krankheit auslösen oder den Verlauf einer Erkrankung verschlechtern kann. Andererseits kann durch die Wiederherstellung des „Gleichgewichts“ der Krankheitsverlauf positiv gestaltet werden. Die Antagonisierung von IL-6 und TNF $\alpha$  wird teilweise schon heute, insbesondere in der Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen erfolgreich angewendet oder es laufen klinische Studien, von denen man sich für die Zukunft noch bessere Behandlungsmöglichkeiten erhofft.

Aus Vorarbeiten war bekannt, dass TNF $\alpha$  die Aktivierung von *signal transducer and activator of transcription* (STAT)3 durch IL-6 blockiert. Weitere Arbeiten legten nahe, dass der TNF $\alpha$ -induzierten Rekrutierung der Tyrosinphosphatase SHP2 an die signalvermittelnde Untereinheit des IL-6 Rezeptorkomplexes hierbei eine wichtige Bedeutung zukommt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nun belegt werden, dass eine rekrutierungsfähige SHP2 wie auch die Aktivierung der p38<sup>MAPK</sup> essentiell für die Hemmung der durch IL-6 induzierten STAT-Aktivierung durch TNF $\alpha$  in Makrophagen und Fibroblasten sind. Hierbei kommt dem Tyrosinrest 759 als SHP2-Rekrutierungsmotiv, welches im zytoplasmatischen Teil von gp130 lokalisiert ist, eine essentielle Bedeutung zu. Austausch dieses Tyrosinrestes gegen ein Phenylalanin hebt den inhibitorischen Einfluss von TNF $\alpha$  auf die Aktivierung von STAT3 durch gp130 vollständig auf. Da es parallel zur Hemmung der STAT-Aktivierung zu einer beschleunigten und verstärkten Aktivierung der ERK<sup>MAPK</sup> kommt, kann angenommen werden, dass der Rekrutierung von SHP2 an gp130 hierbei die Funktion eines molekularen Schalters zukommt, welcher unter Ko-Stimulation von Makrophagen mit TNF $\alpha$  und IL-6 die Komponente der STAT3-Aktivierung durch IL-6 blockiert. Dies ist von Interesse, da durch andere Arbeiten belegt werden konnte, dass Makrophagen, in denen STAT3 nicht aktiviert werden kann, zu einer verstärkten Entzündungsantwort neigen. Die Hemmung der STAT3-Aktivierung durch TNF $\alpha$  würde somit bei entsprechenden Konzentrationsverhältnissen verhindern, dass die STAT3 Aktivierung durch IL-6 die biologische Wirkung von TNF $\alpha$  auf Makrophagen antagonisiert.

## 7 Literaturverzeichnis

---

1. Bode, J.G., et al., *LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages*. FEBS Lett, 1999. **463**(3): p. 365-70.
2. Bode, J.G., et al., *TNF-alpha induces tyrosine phosphorylation and recruitment of the Src homology protein-tyrosine phosphatase 2 to the gp130 signal-transducing subunit of the IL-6 receptor complex*. J Immunol, 2003. **171**(1): p. 257-66.
3. Taga, T. and T. Kishimoto, *gp130 and the interleukin-6 family of cytokines*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 797-819.
4. Bode, J.G. and P.C. Heinrich, *Interleukin-6 signaling during the acute -phase response of the liver*, in *The Liver: Biology and Pathobiology*, I.M. Arias, et al., Editors. 2001, Lippincott Williams Wilkins: Philadelphia. p. 565-580.
5. Heinrich, P.C., et al., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochem J, 1998. **334** ( Pt 2): p. 297-314.
6. Barton, B.E., *The biological effects of interleukin 6*. Med Res Rev, 1996. **16**(1): p. 87-109.
7. Papanicolaou, D.A., et al., *The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease*. Ann Intern Med, 1998. **128**(2): p. 127-37.
8. Romano, M., et al., *Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment*. Immunity, 1997. **6**(3): p. 315-25.
9. Ulich, T.R., et al., *Endotoxin-induced cytokine gene expression in vivo. III. IL-6 mRNA and serum protein expression and the in vivo hematologic effects of IL-6*. J Immunol, 1991. **146**(7): p. 2316-23.
10. Aderka, D., J.M. Le, and J. Vilcek, *IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice*. J Immunol, 1989. **143**(11): p. 3517-23.
11. Aderka, D., et al., *Interleukin-6 inhibits the proliferation of B-chronic lymphocytic leukemia cells that is induced by tumor necrosis factor-alpha or -beta*. Blood, 1993. **81**(8): p. 2076-84.
12. La Flamme, A.C., A.S. MacDonald, and E.J. Pearce, *Role of IL-6 in directing the initial immune response to schistosome eggs*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2419-26.
13. Riedy, M.C. and C.C. Stewart, *Inhibitory role of interleukin-6 in macrophage proliferation*. J Leukoc Biol, 1992. **52**(1): p. 125-7.
14. Gatsios, P., et al., *Oncostatin M differentially regulates tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-3 gene expression in human synovial lining cells*. Eur J Biochem, 1996. **241**(1): p. 56-63.
15. Oh, J.W., et al., *Role of IL-6 and the soluble IL-6 receptor in inhibition of VCAM-1 gene expression*. J Immunol, 1998. **161**(9): p. 4992-9.
16. Tilg, H., et al., *Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55*. Blood, 1994. **83**(1): p. 113-8.
17. Tilg, H., et al., *Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells*. J Exp Med, 1993. **178**(5): p. 1629-36.
18. Moshage, H., *Cytokines and the hepatic acute phase response*. J Pathol, 1997. **181**(3): p. 257-266.

19. Baumann, H. and J. Gauldie, *The acute phase response*. Immunol Today, 1994. **15**(2): p. 74-80.
20. Ramadori, G. and B. Christ, *Cytokines and the hepatic acute-phase response*. Semin Liver Dis, 1999. **19**(2): p. 141-55.
21. Yasukawa, H., et al., *IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages*. Nat Immunol, 2003. **4**(6): p. 551-6.
22. Ernst, M., et al., *Defective gp130-mediated signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling results in degenerative joint disease, gastrointestinal ulceration, and failure of uterine implantation*. J Exp Med, 2001. **194**(2): p. 189-203.
23. Judd, L.M., et al., *Gastric cancer development in mice lacking the SHP2 binding site on the IL-6 family co-receptor gp130*. Gastroenterology, 2004. **126**(1): p. 196-207.
24. Streetz, K.L., et al., *Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases*. Hepatology, 2003. **38**(1): p. 218-29.
25. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
26. Stahl, N., et al., *Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components*. Science, 1994. **263**(5143): p. 92-5.
27. Lütticken, C., et al., *Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130*. Science, 1994. **263**(5143): p. 89-92.
28. Gerhartz, C., et al., *Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 12991-8.
29. Stahl, N., et al., *Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors*. Science, 1995. **267**: p. 1349-1353.
30. Heim, M.H., et al., *Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway*. Science, 1995. **267**(5202): p. 1347-9.
31. Hemmann, U., et al., *Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 12999-3007.
32. Starr, R., et al., *A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling*. Nature (London), 1997. **387**(26): p. 917-921.
33. Endo, T.A., et al., *A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases*. Nature (London), 1997. **387**(26): p. 921-924.
34. Naka, T., et al., *Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor*. Nature (London), 1997. **387**(26): p. 924-929.
35. Haussinger, D., et al., *Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology*. Mol Aspects Med, 2004. **25**(3): p. 221-360.
36. Neidel, J., M. Schulze, and J. Lindschau, *Association between degree of bone-erosion and synovial fluid-levels of tumor necrosis factor alpha in the knee-joints of patients with rheumatoid arthritis*. Inflamm Res, 1995. **44**(5): p. 217-21.
37. Lupia, E., et al., *Role of tumor necrosis factor-alpha and platelet-activating factor in neoangiogenesis induced by synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis*. Eur J Immunol, 1996. **26**(8): p. 1690-4.
38. Neurath, M.F., et al., *Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice*. Eur J Immunol, 1997. **27**(7): p. 1743-50.
39. Kontoyiannis, D., et al., *Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease*. J Exp Med, 2002. **196**(12): p. 1563-74.

40. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
41. Cerami, A., et al., *Weight loss associated with an endotoxin-induced mediator from peritoneal macrophages: the role of cachectin (tumor necrosis factor)*. Immunol Lett, 1985. **11**(3-4): p. 173-7.
42. Cerami, A. and B. Beutler, *The role of cachectin/TNF in endotoxic shock and cachexia*. Immunol Today, 1988. **9**(1): p. 28-31.
43. Higuchi, M., et al., *Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages*. J Immunol, 1990. **144**(4): p. 1425-31.
44. Vassalli, P., *The pathophysiology of tumor necrosis factors*. Annu Rev Immunol, 1992. **10**: p. 411-52.
45. Kriegler, M., et al., *A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF*. Cell, 1988. **53**(1): p. 45-53.
46. Tracey, K.J., H. Vlassara, and A. Cerami, *Cachectin/tumour necrosis factor*. Lancet, 1989. **1**(8647): p. 1122-6.
47. Tracey, K.J., et al., *Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin*. Science, 1986. **234**(4775): p. 470-4.
48. Tracey, K.J., et al., *Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation*. J Exp Med, 1988. **167**(3): p. 1211-27.
49. Perlmutter, D.H., et al., *Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression*. J Clin Invest, 1986. **78**(5): p. 1349-54.
50. Nawroth, P.P., et al., *Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1*. J Exp Med, 1986. **163**(6): p. 1363-75.
51. Dinarello, C.A., et al., *Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1*. J Exp Med, 1986. **163**(6): p. 1433-50.
52. Pober, J.S., et al., *Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon*. J Immunol, 1986. **137**(6): p. 1893-6.
53. Leibovich, S.J., et al., *Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha*. Nature, 1987. **329**(6140): p. 630-2.
54. Strieter, R.M., et al., *Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta*. Science, 1989. **243**(4897): p. 1467-9.
55. Kehrl, J.H., A. Miller, and A.S. Fauci, *Effect of tumor necrosis factor alpha on mitogen-activated human B cells*. J Exp Med, 1987. **166**(3): p. 786-91.
56. Tartaglia, L.A., et al., *The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(20): p. 9292-6.
57. Vandenameele, P., et al., *Functional characterization of the human tumor necrosis factor receptor p75 in a transfected rat/mouse T cell hybridoma*. J Exp Med, 1992. **176**(4): p. 1015-24.
58. Rothe, M., et al., *TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40*. Science, 1995. **269**(5229): p. 1424-7.
59. Grell, M., et al., *TR60 and TR80 tumor necrosis factor (TNF)-receptors can independently mediate cytotoxicity*. Lymphokine Cytokine Res, 1993. **12**(3): p. 143-8.
60. Hsu, H., et al., *TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex*. Immunity, 1996. **4**(4): p. 387-96.
61. Hsu, H., et al., *TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways*. Cell, 1996. **84**(2): p. 299-308.
62. Hsu, H., J. Xiong, and D.V. Goeddel, *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation*. Cell, 1995. **81**(4): p. 495-504.

63. Wallach, D., et al., *Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 331-67.
64. Kischkel, F.C., et al., *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(49): p. 46639-46.
65. Wajant, H. and P. Scheurich, *Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001. **33**(1): p. 19-32.
66. Regnier, C.H., et al., *Identification and characterization of an IkappaB kinase*. *Cell*, 1997. **90**(2): p. 373-83.
67. DiDonato, J.A., et al., *A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB*. *Nature (London)*, 1997. **388**: p. 548-554.
68. DiDonato, J., et al., *Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(4): p. 1295-1304.
69. Malinin, N.L., et al., *MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1*. *Nature*, 1997. **385**(6616): p. 540-4.
70. Maniatis, T., *Catalysis by a multiprotein IkappaB kinase complex*. *Science*, 1997. **278**(5339): p. 818-9.
71. Wang, C.Y., et al., *NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation*. *Science*, 1998. **281**(5383): p. 1680-3.
72. Nishitoh, H., et al., *ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2*. *Mol Cell*, 1998. **2**(3): p. 389-95.
73. Ono, K. and J. Han, *The p38 signal transduction pathway: activation and function*. *Cell Signal*, 2000. **12**(1): p. 1-13.
74. Liu, Z.G., *Adding facets to TNF signaling. The JNK angle*. *Mol Cell*, 2003. **12**(4): p. 795-6.
75. Liu, H., C.R. Lo, and M.J. Czaja, *NF-kappaB inhibition sensitizes hepatocytes to TNF-induced apoptosis through a sustained activation of JNK and c-Jun*. *Hepatology*, 2002. **35**(4): p. 772-8.
76. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. *Nature*, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
77. Schievella, A.R., et al., *MADD, a novel death domain protein that interacts with the type I tumor necrosis factor receptor and activates mitogen-activated protein kinase*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(18): p. 12069-75.
78. Bone, R.C., *The pathogenesis of sepsis*. *Ann Intern Med*, 1991. **115**(6): p. 457-69.
79. Parrillo, J.E., *Pathogenetic mechanisms of septic shock*. *N Engl J Med*, 1993. **328**(20): p. 1471-7.
80. Califf, R.M. and J.R. Bengtson, *Cardiogenic shock*. *N Engl J Med*, 1994. **330**(24): p. 1724-30.
81. Abraham, E., et al., *Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group*. *Lancet*, 1998. **351**(9107): p. 929-33.
82. Parrillo, J.E., et al., *Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy*. *Ann Intern Med*, 1990. **113**(3): p. 227-42.
83. Fisher, C.J., Jr., et al., *Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(26): p. 1697-702.
84. Nasraway, S.A., Jr., *Sepsis research: we must change course*. *Crit Care Med*, 1999. **27**(2): p. 427-30.

85. McCloskey, R.V., et al., *Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CHESSTrial Study Group.* Ann Intern Med, 1994. **121**(1): p. 1-5.
86. Fiedler, V.B., et al., *Monoclonal antibody to tumor necrosis factor--alpha prevents lethal endotoxin sepsis in adult rhesus monkeys.* J Lab Clin Med, 1992. **120**(4): p. 574-88.
87. Opal, S.M., et al., *Efficacy of antilipopolysaccharide and anti-tumor necrosis factor monoclonal antibodies in a neutropenic rat model of Pseudomonas sepsis.* J Clin Invest, 1991. **88**(3): p. 885-90.
88. Martin, C., et al., *Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma.* Crit Care Med, 1997. **25**(11): p. 1813-9.
89. Damas, P., et al., *Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity.* Ann Surg, 1992. **215**(4): p. 356-62.
90. Calandra, T., et al., *High circulating levels of interleukin-6 in patients with septic shock: evolution during sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines. The Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group.* Am J Med, 1991. **91**(1): p. 23-9.
91. Nasraway, S.A., *The problems and challenges of immunotherapy in sepsis.* Chest, 2003. **123**(5 Suppl): p. 451S-9S.
92. Han, J., T. Brown, and B. Beutler, *Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level.* J Exp Med, 1990. **171**(2): p. 465-75.
93. Kontoyiannis, D., et al., *Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies.* Immunity, 1999. **10**(3): p. 387-98.
94. Han, J. and R.J. Ulevitch, *Emerging targets for anti-inflammatory therapy.* Nat Cell Biol, 1999. **1**(2): p. E39-40.
95. Kotlyarov, A., et al., *MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis.* Nat Cell Biol, 1999. **1**(2): p. 94-7.
96. Lorenz, H.M. and J.R. Kalden, *Perspectives for TNF-alpha-targeting therapies.* Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S17-24.
97. St Clair, E.W., et al., *Combination of infliximab and methotrexate therapy for early rheumatoid arthritis: a randomized, controlled trial.* Arthritis Rheum, 2004. **50**(11): p. 3432-43.
98. Campbell, J., et al., *A novel mechanism for TNF-alpha regulation by p38 MAPK: involvement of NF-kappa B with implications for therapy in rheumatoid arthritis.* J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6928-37.
99. Perregaux, D.G., et al., *Inhibition of interleukin-1 beta production by SKF86002: evidence of two sites of in vitro activity and of a time and system dependence.* Mol Pharmacol, 1995. **48**(3): p. 433-42.
100. Johnson, G.V. and C.D. Bailey, *The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease.* Exp Neurol, 2003. **183**(2): p. 263-8.
101. Hollenbach, E., et al., *Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF-kappaB-signaling suppresses inflammatory bowel disease.* Faseb J, 2004. **18**(13): p. 1550-2.
102. Mudgett, J.S., et al., *Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): p. 10454-9.
103. Adams, R.H., et al., *Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development.* Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 109-16.
104. Nagata, Y. and K. Todokoro, *Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and of inhibition of ERK for apoptosis.* Blood, 1999. **94**(3): p. 853-63.



105. Natale, D.R., et al., *p38 MAPK signaling during murine preimplantation development*. Dev Biol, 2004. **268**(1): p. 76-88.
106. Baud, V. and M. Karin, *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(9): p. 372-7.
107. Wada, Y., et al., *R-130823, a novel inhibitor of p38 MAPK, ameliorates hyperalgesia and swelling in arthritis models*. Eur J Pharmacol, 2005. **506**(3): p. 285-95.
108. Haspel, R.L., M. Salditt-Georgieff, and J.J.E. Darnell, *The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase*. Embo J, 1996. **15**(22): p. 6262-6268.
109. Chung, C.D., et al., *Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3*. Science, 1997. **278**(5344): p. 1803-1805.
110. Liu, B., et al., *Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1*. Proc Natl Acad Sci USA, 1998. **95**(18): p. 10626-10631.
111. Hilton, D.J., *Negative regulators of cytokine signal transduction*. Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(12): p. 1568-77.
112. 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): p. 6964-9.
113. 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): p. 1525-33.
114. 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): p. 557-65.
115. Symes, A., et al., *The protein tyrosine phosphatase SHP-2 negatively regulates ciliary neurotrophic factor induction of gene expression*. Curr Biol, 1997. **7**(9): p. 697-700.
116. Wen, Z., Z. Zhong, and J.E. Darnell, Jr., *Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation*. Cell, 1995. **82**(2): p. 241-50.
117. Schuringa, J.J., et al., *Interleukin-6-induced STAT3 transactivation and Ser727 phosphorylation involves Vav, Rac-1 and the kinase SEK-1/MKK-4 as signal transduction components*. Biochem J, 2000. **347** Pt 1: p. 89-96.
118. Eilers, A., et al., *Differentiation-regulated serine phosphorylation of STAT1 promotes GAF activation in macrophages*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(7): p. 3579-86.
119. Ng, J. and D. Cantrell, *STAT3 is a serine kinase target in T lymphocytes - Interleukin 2 and T cell antigen receptor signals converge upon serine 727*. J Biol Chem, 1997. **272**(39): p. 24542-24549.
120. Zhang, X., et al., *Requirements of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes*. Science, 1995. **267**: p. 1990-1994.
121. Jain, N., et al., *Repression of Stat3 activity by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK)*. Oncogene, 1998. **17**(24): p. 3157-67.
122. Jain, N., et al., *Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 24392-400.
123. Lim, C.P. and X. Cao, *Serine phosphorylation and negative regulation of Stat3 by JNK*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 31055-61.
124. Sengupta, T.K., et al., *Rapid inhibition of interleukin-6 signaling and stat3 activation mediated by mitogen-activated protein kinases*. Proc Natl Acad Sci USA, 1998. **95**(19): p. 11107-11112.
125. Kim, T.K. and T. Maniatis, *Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway*. Science, 1996. **273**: p. 1717-1719.

126. Ahmed, S.T. and L.B. Ivashkiv, *Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and Stat activation by inflammatory and stress pathways*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 5227-37.
127. Buettner, R., L.B. Mora, and R. Jove, *Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(4): p. 945-54.
128. Rane, S.G. and E.P. Reddy, *Janus kinases: components of multiple signaling pathways*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5662-79.
129. Rane, S.G. and E.P. Reddy, *JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis*. Oncogene, 2002. **21**(21): p. 3334-58.
130. Bowman, T., et al., *STATs in oncogenesis*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2474-88.
131. Schmitz, J., et al., *SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130*. J Biol Chem, 2000. **275**(17): p. 12848-56.
132. Ahmed, S.T., et al., *Inhibition of IL-6 signaling by a p38-dependent pathway occurs in the absence of new protein synthesis*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(1): p. 154-62.
133. Ludwig, S., et al., *The stress inducer arsenite activates mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 via a MAPK kinase 6/p38-dependent pathway*. J Biol Chem, 1998. **273**(4): p. 1917-22.
134. Stoiber, D., et al., *Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma*. J Immunol, 1999. **163**(5): p. 2640-7.
135. Nicholson, S.E., et al., *Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130*. Proc Natl Acad Sci USA, 2000. **97**: p. 6493-6498.
136. Fukada, T., et al., *Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: Involvement of STAT3 in anti- apoptosis*. Immunity, 1996. **5**(5): p. 449-460.
137. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 153-83.
138. Wen, Z. and J.E. Darnell, Jr., *Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(11): p. 2062-7.
139. Abe, K., et al., *The YXXQ motif in gp 130 is crucial for STAT3 phosphorylation at Ser727 through an H7-sensitive kinase pathway*. Oncogene, 2001. **20**(27): p. 3464-74.
140. Lehmann, U., et al., *SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130*. J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 661-71.
141. Li, J., et al., *Transcriptional induction of MKP-1 in response to stress is associated with histone H3 phosphorylation-acetylation*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(23): p. 8213-24.
142. Bokemeyer, D., et al., *Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 by the stress-activated protein kinase signaling pathway but not by extracellular signal-regulated kinase in fibroblasts*. J Biol Chem, 1996. **271**(2): p. 639-42.
143. Schliess, F., S. Heinrich, and D. Haussinger, *Hyperosmotic induction of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP-1 in H4IIE rat hepatoma cells*. Arch Biochem Biophys, 1998. **351**(1): p. 35-40.
144. Tebbutt, N.C., et al., *Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice*. Nat Med, 2002. **8**(10): p. 1089-97.
145. Kopf, M., et al., *Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice*. Nature, 1994. **368**(6469): p. 339-42.
146. Ramsay, A.J., et al., *The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo*. Science, 1994. **264**(5158): p. 561-3.

- 
147. Takeda, K., et al., *Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils*. *Immunity*, 1999. **10**(1): p. 39-49.
  148. Decker, T. and P. Kovarik, *Serine phosphorylation of STATs*. *Oncogene*, 2000. **19**(21): p. 2628-37.

---

## 8 Danksagung

---

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Johannes G. Bode, unter dessen Leitung und Betreuung diese Arbeit angefertigt wurde. Ich möchte mich bei ihm bedanken für seine kontinuierliche theoretische und experimentelle Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und Anregungen, sowie für die gründliche Durchsicht und Korrektur der schriftlichen Abfassung meiner Arbeit, aber auch für seine menschliche Art und Weise, wie er mich an die wissenschaftliche Arbeit herangeführt und mich für sie begeistert hat. Ich möchte mich bei ihm auch für die schöne Zeit ausserhalb des Labors bedanken, die wir mit der Arbeitsgruppe bei unterschiedlichen Aktivitäten (Weihnachtsessen, Kinoabende) hatten.

Herrn Professor Dr. med. Dieter Häussinger danke ich für die tatkräftige Unterstützung der gesamten Arbeitsgruppe, für die stetige Bereitschaft zur Diskussion erhobener Befunde sowie für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in den Laboratorien seiner Klinik an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf durchführen zu können.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, ohne die diese Arbeit nicht in dem Umfang möglich gewesen wäre, die immer für mich da waren, mir den Rücken freigehalten haben und mich kontinuierlich während meiner kompletten Ausbildung bestmöglich unterstützt haben.

Mein Dank geht auch an Verena Hupke, die mir auch nach frustrierenden experimentellen Ergebnissen immer wieder neue Motivation gegeben hat.

Schliesslich bedanke ich mich bei gesamten Arbeitsgruppe Bode, vor allem bei Christian Ehling, dem ich die Erlernung mehrerer Methoden verdanke und der für mich jederzeit für Fragen hilfsbereit zur Verfügung stand, bei Ute Albrecht, der „Guten Seele“ des Labors, bei Renato Pejcinovic, für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft, die ich während der gesamten Zeit der gemeinsamen Arbeit erfahren habe. Bei Jessica Matthes und Marianne Ruhl möchte ich mich zusätzlich für die Unterstützung bei verschiedenen experimentellen Arbeiten bedanken.

Mein Dank geht an alle Mitarbeiter der Experimentellen Hepatologie, die dafür gesorgt haben, dass mir das Arbeiten trotz der aufgetretenen experimentellen Rückschläge in den Jahren viel Freude bereitet hat.

## 9 Lebenslauf

---

Name: Jan Kehrmann

Geburtsdatum: 25. Juni 1978

Geburtsort: Neuss (NRW)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Eltern: Karl Kehrmann  
Margret Kehrmann, geb. Varnhagen

Schulbildung: Grundschule in Neuss von 1984 bis 1988  
  
Marie-Curie-Gymnasium in Neuss von 1988-1997 (Abitur)  
gleichzeitige Ausbildung zum chemisch technischen  
Assistenten am Marie-Curie-Gymnasium Neuss von 1995-1997  
  
Schule für Metalltechnik und Chemie in Düsseldorf: Abschluss  
der Ausbildung zum CTA von 1997-1998

Zivildienst: Zivildienstleistender im Johanna-Etienne Krankenhaus in Neuss  
von 1998-1999

Studium: Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
von 1999-2005  
Physikum: Oktober 2001  
1. Staatsexamen: September 2002  
2. Staatsexamen: Oktober 2004  
3. Staatsexamen: November 2005

Beruf: Seit Januar 2006 Assistenzarzt in der kardiologischen Klinik im  
Evangelischen Krankenhaus in Düsseldorf