

**Molekulare Mechanismen der Oncostatin M-
vermittelten Signaltransduktion und deren
Bedeutung in der Entzündung sowie der
antiviralen Immunabwehr**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Christoph Hintzen
aus Jülich

Würzburg im Februar 2009

Eingereicht am: 19.02.2009

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. J. Müller

Gutachter: PD. Dr. H. M. Hermanns

Gutachter: Prof. Dr. T. D. Müller

Tag des Promotionskolloquiums: 06.05.2009

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Veröffentlichungen

- C. Hintzen, C. Evers, B.E. Lippok, R. Volkmer, P.C. Heinrich, S. Radtke and H.M. Hermanns (2008) „Box 2 Region of the Oncostatin M Receptor Determines Specificity for Recruitment of Janus Kinases and STAT5 Activation”
J.Biol.Chem. 283: 19465-19477
- C. Hintzen, C. Haan, J.P. Tuckermann, P.C. Heinrich and H.M. Hermanns (2008)
„Oncostatin M-Induced and Constitutive Activation of the JAK/STAT5/CIS Pathway Suppresses CCL1, but not CCL7 and CCL8, Chemokine Expression“
J.Immunol. 181: 7341-7349
- C. Hintzen*, S. Quaiser*, T. Pap, P.C. Heinrich, H.M. Hermanns (2009) „Induction of CCL13 Expression in Synovial Fibroblasts Underlines a Significant Role of Oncostatin M in Rheumatoid Arthritis“
Arthritis Rheum. in press
- C. Hintzen, A.P. Costa-Pereira, P.C. Heinrich, H.M. Hermanns (2009) „Oncostatin M Induces RIG-I and MDA5 Expression and Boosts the IFN γ Antiviral Response of Primary Fibroblasts“
in Vorbereitung

* gleichberechtigte Erstautoren

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Verzeichnis der Abkürzungen	X
I. Einleitung.....	1
I.1 Zytokine und ihre Funktionen	1
I.2 Die Familie der IL-6-Typ Zytokine und ihre Rezeptorkomplexe	2
I.3 Signaltransduktion über IL-6-Typ Zytokinrezeptorkomplexe	5
I.3.1 Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg.....	5
I.3.2 Der Ras/Raf/MAPK-Signalweg	10
I.3.3 Regulationsmechanismen zytokininduzierter Signalkaskaden	11
I.4 OSM induziert die Expression von Chemokinen.....	12
I.5 Die Bedeutung von OSM in der antiviralen Immunabwehr	14
I.6 Ziel der Arbeit.....	15
II. Material und Methoden	18
II.1 Materialien	18
II.1.1 Chemikalien.....	18
II.1.2 Puffer und Medien	18
II.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	18
II.1.4 Reaktionskits	18
II.1.5 Enzyme	19
II.1.6 Zytokine und Rezeptoren.....	19
II.1.7 Antikörper	20
II.1.8 Vektoren und rekombinante Plasmide	23
II.1.9 Eukaryontische Zellen	25
II.1.10 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur.....	27
II.1.11 Bakterienstamm.....	28
II.2 Zellbiologische Methoden	28
II.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen	28
II.2.2 Isolation und Kultivierung primärer humaner Blutmonozyten aus <i>buffy coats</i>	29

II.2.3	Isolation und Kultivierung primärer humaner T-Lymphozyten aus <i>buffy coats</i>	30
II.2.4	Isolation und Kultivierung primärer humaner neutrophiler Granulozyten aus <i>buffy coats</i>	30
II.2.5	Transfektion eukaryontischer Zellen	31
II.2.5.1	Transiente Transfektion mit FuGene	31
II.2.5.2	Transiente Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)	31
II.2.5.3	Transfektion von siRNA.....	32
II.2.6	Migrationsassay.....	32
II.3	Molekularbiologische Methoden	33
II.3.1	Kultivierung und Lagerung von Bakterienkulturen	33
II.3.2	Herstellung kompetenter Bakterien.....	33
II.3.3	Transformation kompetenter Bakterien	34
II.3.4	Qiagen-Plasmid-Mini- <i>kit</i>	34
II.3.5	Qiagen-Plasmid-Maxi- <i>kit</i>	34
II.3.6	Extraktion von RNA	34
II.3.7	Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren.....	35
II.3.8	Restriktion von DNA	35
II.3.9	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	35
II.3.10	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36
II.3.11	Ligation von DNA-Fragmenten.....	36
II.3.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
II.3.13	Reverse Transkriptase-PCR	37
II.3.14	DNA-Sequenzierung.....	38
II.3.15	RNase Protection Assay (RPA)	38
II.3.15.1	Radioaktive Markierung der Sonden	39
II.3.15.2	Hybridisierung	40
II.3.15.3	Verdau der einzelsträngigen RNA	40
II.3.15.4	Denaturierende Gelelektrophorese	41
II.4	Proteinchemische und immunologische Methoden	42
II.4.1	Herstellung von Zelllysaten.....	42
II.4.2	Zellfraktionierung	43
II.4.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	44
II.4.4	Immun- und Koimmunpräzipitation von Proteinen aus Zelllysaten	45
II.4.5	Proteinpräzipitation mit biotinylierten Peptiden.....	46

II.4.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	46
II.4.7	Elektro-Western Blot.....	47
II.4.8	Detektion präzipitierter Proteine mit Hilfe des Immunblots	48
II.4.9	Durchflusszytometrie	49
II.4.10	ELISA	50
III.	Ergebnisse.....	51
III.1	Studien zur OSM-induzierten STAT5-Aktivierung.....	51
III.1.1	OSM vermittelt die Translokation von aktiviertem STAT1, STAT3 und STAT5 in den Zellkern	51
III.1.2	Die OSM-induzierte STAT5-Phosphorylierung ist OSMR-abhängig	52
III.1.3	Der humane OSMR vermittelt die Aktivierung von STAT5 über das Doppelyrosinmotiv Y ₈₃₇ LY ₈₃₉ L	53
III.1.4	Der murine OSMR vermittelt die Aktivierung von STAT5 mit Hilfe rezeptorassoziierter Janus Kinasen	57
III.1.5	Die Box2-Region des murinen OSMR ist für die tyrosinunabhängige STAT5 Aktivierung verantwortlich	59
III.1.6	Die F ₈₂₀ C-Mutation in der Box2-Region des humanen OSMR beeinflusst die Rekrutierung der Janus Kinasen	61
III.1.7	JAK2 ist für die Phosphorylierung von STAT5 essentiell.....	64
III.2	Die Bedeutung von CCL1 für die OSM-vermittelte Entzündungsreaktion	66
III.2.1	Oncostatin M induziert die Expression von CCL1, CCL7 und CCL8 in humanen dermalen Fibroblasten	66
III.2.2	Die OSM-induzierte Expression von CCL1 und CCL8 stimuliert die Migration von Leukozyten	69
III.2.3	Während ERK1/2 die Transkription von Chemokinen beeinflusst, stabilisiert p38 die Chemokin-mRNA durch einen TTP-inhibierenden Mechanismus	71
III.2.4	Die OSM-vermittelte Expression von CCL1 wird durch STAT5 negativ reguliert	75
III.2.5	Eine konstitutive Aktivierung des JAK2/STAT5-Signalwegs in Zellen akuter myeloider Leukämie unterdrückt die CCL1-Expression	80
III.3	Die Bedeutung von OSM-induziertem CCL13 in der rheumatoiden Arthritis.....	83

III.3.1	Ausschließlich synoviale Fibroblasten sind durch eine OSM-induzierte CCL13-Expression charakterisiert	83
III.3.2	Durch die Sekretion von OSM induzieren primäre Neutrophile die Expression von CCL13	86
III.3.3	Die CCL13-Induktion in HSFs wird vornehmlich durch OSM und nicht durch IL-1 β , IL-6 oder TNF α vermittelt	87
III.3.4	Sezerniertes CCL13 induziert die Migration von primären Monozyten	91
III.3.5	Eine verlängerte STAT5-Aktivierung ermöglicht die OSM-induzierte CCL13-Expression.....	93
III.3.6	Die OSM-abhängige p38-Aktivierung stabilisiert die CCL13-mRNA über einen TTP-inhibierenden Mechanismus.....	95
III.3.7	Die gemeinsame Hemmung von STAT5 und ERK1/2 führt zu einer reduzierten Monozytenrekrutierung	98
III.4	Der Einfluss von Oncostatin M auf den antiviralen Status von Lungenfibroblasten	99
III.4.1	Die RNA-Helikasen RIG-I und MDA5 sind <i>immediate-early</i> Gene von Oncostatin M	100
III.4.2	Die OSM-induzierte RIG-I-Expression ist auf Fibroblasten beschränkt	101
III.4.3	Die Expression von RIG-I erfordert eine gleichzeitige Tyrosin- und Serinphosphorylierung von STAT1	103
III.4.4	OSM sensibilisiert Fibroblasten für eine bevorstehende Behandlung mit poly(I:C).....	105
III.4.5	Eine Präinkubation mit OSM ermöglicht die IFN β -Sekretion auch infolge einer eigentlich ineffizienten poly(I:C)-Stimulation.....	107
III.4.6	Das M-Protein des <i>vesicular stomatitis virus</i> verhindert die OSM-induzierte Expression der DExD/H-Box Helikasen.....	109
IV.	Diskussion.....	112
IV.1	Molekulare Mechanismen der OSM-vermittelten STAT1-, STAT3- und STAT5-Aktivierung.....	112
IV.1.1	Evolutionär diverse Mechanismen führen zur OSM-induzierten STAT5-Phosphorylierung.....	112
IV.1.1.1	Die OSM-vermittelte STAT5-Aktivierung ist OSMR-abhängig	113

IV.1.1.2 Das Doppelyrosinmotiv Y ₈₃₇ LY ₈₃₉ L im humanen OSMR rekrutiert STAT5.....	113
IV.1.1.3 Eine präferenzielle Rekrutierung von JAK2 führt im murinen System zur STAT5-Phosphorylierung	114
IV.1.1.4 JAK2 und STAT5 können direkt interagieren.....	115
IV.1.1.5 JAK1 übernimmt im humanen System die Rolle einer Initiator kinase.....	116
IV.1.2 STAT1 und STAT3 werden durch evolutionär konservierte Mechanismen phosphoryliert	117
IV.1.2.1 Die tyrosinunabhängige Phosphorylierung von STAT1 wird insbesondere durch JAK1 vermittelt.....	117
IV.1.2.2 STAT3 wird tyrosinabhängig aktiviert	118
IV.2 Eine OSM-vermittelte, konstitutive Aktivierung des JAK2/STAT5/CIS-Signalwegs unterbindet die Synthese und Sekretion des Chemokins CCL1	118
IV.2.1 Die OSM-induzierte Expression von inflammatorischen Chemokinen ist physiologisch relevant	119
IV.2.2 Induktive und repressive Signalwege steuern die OSM-vermittelte Chemokinexpression	120
IV.2.2.1 Aktiviertes p38 garantiert die Stabilisierung der Chemokin-mRNAs	120
IV.2.2.2 Die MAP-Kinasen ERK1/2 ermöglichen eine verstärkte Transkription von CCL1, CCL7 und CCL8.....	121
IV.2.2.3 STAT5 übt einen reprimierenden Effekt auf die OSM-induzierte CCL1-Expression aus	121
IV.2.3 Die JAK2-Mutation V ₆₁₇ F zieht die Suppression von CCL1 nach sich	122
IV.3 Die CCL13-Induktion in synovialen Fibroblasten unterstreicht die signifikante Bedeutung von OSM in der rheumatoiden Arthritis	123
IV.3.1 Die Induktion von CCL13 in der rheumatoiden Arthritis.....	125
IV.3.2 Die OSM-induzierte CCL13-Expression wird STAT5-abhängig vermittelt ...	126
IV.3.3 Die Bedeutung der MAP-Kinasen für die CCL13-Expression in synovialen Fibroblasten	126
IV.3.4 Die konstitutive CCL13-Expression in RASFs.....	127
IV.3.5 Die physiologische Bedeutung von CCL13 für die rheumatoide Arthritis.....	128
IV.4 Der Einfluss von OSM auf den Ablauf einer antiviralen Immunantwort.....	129

IV.4.1 Oncostatin M induziert die RNA-Helikasen RIG-I und MDA5 in primären Fibroblasten.....	130
IV.4.2 Die durch p38 vermittelte STAT1-Serinphosphorylierung ermöglicht die Expression der DExD/H-Box Helikasen	131
IV.4.3 OSM-stimulierte Lungenfibroblasten sind für eine Stimulation mit dem synthetischen dsRNA Analog poly(I:C) sensibilisiert	133
IV.4.4 Als Überlebensstrategie inhibiert das VSV die OSM-induzierte RIG-I- und MDA5-Expression	133
V. Ausblick.....	136
V.1 Die Rekrutierung von JAK2 an den OSMR.....	136
V.2 Die Bedeutung des <i>feedback</i> -Inhibitors CIS für die OSM-induzierte CCL1-Expression.....	137
V.3 Der Einfluss von CCL13 auf die Pathogenese einer rheumatoiden Arthritis	138
V.4 Die antivirale Wirkungsweise der OSM-induzierten DExD/H-Box Helikasen RIG-I und MDA5	140
VI. Zusammenfassung/Summary	142
VI.1 Zusammenfassung	142
VI.2 Summary	144
VII. Literatur	147

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APP	Akutphase-Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gal	β-Galaktosidase
BIM	Bisindolylmaleimid
BRIJ	Polyoxyethylen-10-oleylether
BSA	bovines Serumalbumin
CARD	<i>caspase-recruitment domain</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CH	<i>collagen</i> -Homologie-Domäne
CIS	<i>cytokine inducible SH2-domain-containing protein</i>
CLC	<i>cardiotrophin-like cytokine</i>
CLF	<i>cytokine-like factor</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CT-1	<i>cardiotrophin-1</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Extinktion
E.coli	Escherichia coli
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
ESS	<i>extended SH2 subdomain</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GBP	<i>guanylate binding protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	<i>granulocyte monocyte-colony stimulating factor</i>
gp	Glykoprotein

Grb	<i>growth factor receptor bound protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBS	<i>Hepes buffered saline</i>
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPRT	<i>hypoxanthine phosphoribosyl-transferase</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
hu	human
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISG	<i>interferon stimulated gene</i>
JAK	Janus Kinase
JH	JAK-Homologie Region
KD	Kinasedomäne
kDa	Kilodalton
KIR	Kinase inhibitorische Region
LB	Luria-Bertani-Medium
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Luc	Luziferase
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated gene-5</i>
MEK	MAP/Erk Kinase
min	Minute
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mu	murin
n.d.	<i>not detectable</i>
NDV	<i>Newcastle disease virus</i>
Neo ^R	Neomycin-Resistenz
OD	optische Dichte
OSM	Oncostatin M
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PEI	<i>polyethylenimine</i>
Pen ^R	Penicillin-Resistenz
PIAS	<i>protein inhibitor of activated STATs</i>
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C γ

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly(I:C)	<i>polyinosine-polycytidylic acid</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTP	Phosphotyrosinphosphatase
pY	Phosphotyrosin
R	Rezeptor
RA	rheumatoide Arthritis
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene</i>
RLR	<i>RIG-I-like-receptor</i>
rp	<i>reverse primer</i>
RPA	<i>RNase Protection Assay</i>
RT	Raumtemperatur
S.D.	<i>standard deviation</i>
SDS	<i>sodium-dodecylsulfate</i>
sec	Sekunde
SeV	<i>Sendai virus</i>
SH	Src-Homologie-Domäne
Shc	<i>SH2-/CH-domain-containing protein</i>
SHP	<i>SH2-domain-containing tyrosine phosphatase</i>
SN	<i>supernatant</i>
siRNA	<i>small-interfering RNA</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
sp	Sequenz-Primer
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TCA-3	<i>T-cell activation-3</i>
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TM	Transmembranregion
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxy)aminomethan
TTP	Tristetraprolin
U	<i>unit</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vol	Volumen
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
WB	Western Blot
ZBM	Zytokin-bindendes Modul

I. Einleitung

I.1 Zytokine und ihre Funktionen

Zur Koordination und Funktion eines vielzelligen Organismus ist ein höchst komplexes Kommunikationssystem erforderlich. Hierzu gehören einerseits lokale chemische Mediatoren, wie etwa Prostaglandin E₂ oder Histamin, die in unmittelbarer Nähe ihres Produktionsortes von Zellen aufgenommen und wieder abgebaut werden können. Andererseits sind Hormone, wie zum Beispiel Insulin oder Glukagon, zu nennen, die von spezialisierten Zellen sezerniert werden und endokrin über den Blutstrom auch weiter entfernte Zielgewebe erreichen können. Neben diesen klassischen Hormonen sind parakrin oder autokrin wirkende Zytokine wichtige Mediatoren innerhalb eines solchen Kommunikationssystems.

Ursprünglich hielt man Zytokine für immunregulatorische Substanzen, doch inzwischen ist man sich ihrer weitreichenderen und essentiellen Funktionen bewusst. Sie nehmen nicht nur eine zentrale und pleiotrope Funktion für Wachstum und Differenzierung eines Organismus ein, sondern regulieren auch Proliferation, Differenzierung und funktionelle Prägung von Zellen des Immunsystems und des blutbildenden Systems (1,2). Außerdem beteiligen sie sich an Entzündungsprozessen und an der embryonalen, neuronalen und hämatopoetischen Entwicklung des Organismus.

Zytokine können additiv, synergistisch und auch antagonistisch wirken und beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Synthese. Sie wirken auf ihre Zielzellen, indem sie an spezifische Rezeptorsysteme binden und nach Übermittlung des Signals in den Zellkern zur Induktion der Transkription von Zielgenen führen können.

Die Klassifizierung von Zytokinen kann nach drei verschiedenen Kriterien erfolgen: aufgrund ihrer biologischen Wirkung, nach der Nutzung ihrer Oberflächenrezeptoren und entsprechend ihrer dreidimensionalen Struktur (3). So ist zum Beispiel die Familie der IL-6-Typ Zytokine durch ihre vier- α -Helix-Struktur gekennzeichnet.

I.2 Die Familie der IL-6-Typ Zytokine und ihre Rezeptorkomplexe

Das Interleukin-6 (IL-6) hat der Familie der IL-6-Typ Zytokine ihren Namen gegeben. Mittlerweile umfasst diese 9 Mitglieder: IL-6, IL-11, *leukemia inhibitory factor* (LIF), Oncostatin M (OSM), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), Cardiotrophin-1 (CT-1), *cardiotrophin-like cytokine* (CLC), Neuropoietin (NP) und IL-27 (3-6).

Alle IL-6-Typ Zytokine definieren sich über die gemeinsame Nutzung des Glykoproteins gp130 als signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit und besitzen zusätzlich eine vergleichbare dreidimensionale Struktur (vier antiparallel in einem Bündel angeordnete α -Helices) (3). Sie haben sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften und sind an der Akutphase-Reaktion des Körpers (7-12), an der Hämatopoese (1,13), der Differenzierung und dem Wachstum von B- und T-Zellen (2,14,15) sowie an der neuronalen Differenzierung beteiligt (3).

Wie auch alle anderen Zytokine üben die IL-6-Typ Zytokine ihre Wirkung auf Zielzellen aus, indem sie an spezifische, hochaffine Zelloberflächenrezeptoren binden, die aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft der Superfamilie der hämatopoetischen Rezeptoren angehören. Ein extrazellulär gelegener N-Terminus und eine einzelne Transmembrandomäne weisen diese Rezeptoren weiterhin als Typ-I-Membranrezeptoren aus (16). Lediglich der CNTF-Rezeptor bildet hier eine Ausnahme, da er einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker anstelle einer Transmembrandomäne besitzt (17). Die hämatopoetischen Rezeptoren werden in Klasse I- und Klasse II-Rezeptoren unterteilt (16). Da sich die Rezeptoren der IL-6-Typ Zytokine durch mindestens ein zytokinbindendes Modul (ZBM) aus zwei Fibronectin-Typ III-ähnlichen Domänen in der extrazellulären Domäne auszeichnen, zählen sie zu den Klasse I-Rezeptoren. Die N-terminale Domäne dieser Fibronectin-ähnlichen Domänen enthält vier konservierte Cysteine, die C-terminale Domäne ein den Klasse II-Rezeptoren fehlendes Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin-Motiv (WSXWS) (16). Das ZBM ist von entscheidender

Bedeutung für die Zytokinbindung. Weitere Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domänen der IL-6-Typ Zytokine scheinen ebenfalls daran beteiligt zu sein.

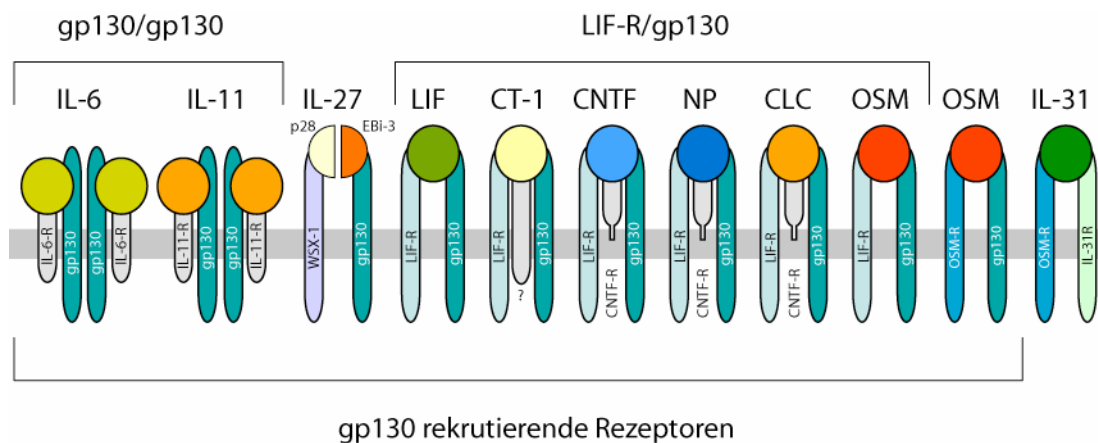


Abb.1: Rezeptorkomplexe der IL-6-Typ Zytokine

Mit Ausnahme von IL-31 rekrutieren alle IL-6-Typ Zytokine die Rezeptoruntereinheit gp130, wobei entweder eine Homodimerisierung zweier gp130-Moleküle oder eine Heterodimerisierung von gp130 mit dem LIFR, OSMR oder WSX-1 induziert wird. IL-31 signalisiert über ein Heterodimer aus dem OSMR und dem IL-31R. IL-6, IL-11, CNTF, NP und CLC binden außerdem an ihren α -Rezeptor, den IL-6R, IL-11R bzw. CNTFR. Für IL-6 und IL-11 werden derzeit hexamere Komplexe als wahrscheinlich angesehen.

Alle IL-6-Typ Zytokine wirken über die signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit gp130, üben ihre spezifische Wirkung jedoch über verschiedene Rezeptorkomplexe aus (Abb.1). IL-6 und IL-11 signalisieren über einen Rezeptorkomplex bestehend aus zwei spezifischen, nicht signalisierenden α -Rezeptoren (IL-6-Rezeptor (18), IL-11-Rezeptor (19)) und einem gp130-Homodimer (20-22). CNTF, NP und CLC binden ebenfalls an einen α -Rezeptor, den CNTF-Rezeptor (17), signalisieren aber über ein Heterodimer aus LIF-Rezeptor und gp130 (23). Für CLC wurde gezeigt, dass es im Komplex mit dem *cytokine-like factor-1* (CLF-1) sezerniert wird (24). Im Weiteren gibt es Hinweise für die Existenz einer α -Rezeptoruntereinheit für CT-1 (25). Im Gegensatz zu den bisher genannten Zytokinen besitzen LIF und OSM keinen nicht an der Signalweiterleitung beteiligten α -Rezeptor, sondern signalisieren direkt über ein Heterodimer aus gp130 und LIFR. Zusätzlich ist OSM in der Lage, ein Heterodimer bestehend aus gp130 und OSMR zu nutzen und ist damit das einzige Zytokin der Familie, das beim Menschen über zwei Rezeptorkomplexe

signalisieren kann (26,27). Nach Stimulation bindet OSM zunächst mit geringer Affinität an gp130. Erst die Rekrutierung des LIFR bzw. des OSMR führt zur Ausbildung des hochaffinen Rezeptorkomplexes (28,29). IL-27 bindet an ein Dimer aus gp130 und seinem spezifischen Rezeptor WSX-1 (30). Ein neueres Mitglied der Interleukin-Familie, IL-31, wird als nächster Verwandter der IL-6-Typ Zytokine angesehen, seitdem gezeigt werden konnte, dass anstelle von gp130 der neu klonierte Zytokinrezeptor IL-31R, ursprünglich GPL (*gp130-like receptor*) genannt, rekrutiert wird (31), um mit dem spezifischen OSMR einen neuen Rezeptorkomplex für dieses Zytokin zu bilden (32).

Die Expression der Rezeptoruntereinheiten ist mit Ausnahme des ubiquitär gebildeten gp130 auf bestimmte Zellen beschränkt, was eine spezifische Regulation der Signaltransduktion der einzelnen Zytokine ermöglicht. Die α -Rezeptoren IL-6R, IL-11R und CNTFR kommen außer in membranständiger auch in löslicher Form vor. Für die Entstehung wurden zwei Mechanismen beschrieben: zum einen eine limitierte Proteolyse (*shedding*), zum anderen ein alternatives Spleißen der mRNA (33,34). Die löslichen Rezeptoren sIL-6R, sIL-11R und sCNTFR können agonistisch wirken, indem sie nach ihrer Bindung die signaltransduzierenden Ketten dimerisieren (35). Damit stehen sie im Kontrast zu anderen Rezeptoren, deren lösliche Rezeptorformen eine antagonistische Wirkung zeigen. Die Bedeutung dieses Agonismus ist seit der Entdeckung der löslichen Form des gp130 umstritten, da z.B. die löslichen Formen des IL-6R und des gp130 gemeinsam eine Art Puffersystem bilden und somit systemische Effekte von IL-6 modulieren könnten (36).

Die Zytokine besitzen drei spezifische *sites*, mit denen sie an die Rezeptoren binden. Während *site I* an das ZBM der α -Rezeptoren bindet und *site II* mit dem ZBM von gp130 interagiert, wird *site III* von der Ig-ähnlichen Domäne der zweiten signalisierenden Rezeptoruntereinheit erkannt (36-38).

Die Stöchiometrie der IL-6-Typ Zytokin-Rezeptorkomplexe ist noch nicht abschließend geklärt. Die Kristallstruktur der extrazellulären, zytokinbindenden Region von IL-6/IL-6R/gp130 zeigt eine hexamere Struktur, wobei als membranständiger Rezeptorkomplex auch ein Tetramer vorgeschlagen wird (39).

I.3 Signaltransduktion über IL-6-Typ Zytokinrezeptorkomplexe

Am Anfang einer Signaltransduktion über Zytokinrezeptoren steht die ligandeninduzierte Homo- oder Heterodimerisierung der drei signalweiterleitenden Rezeptorketten gp130, LIFR oder OSMR. Dies führt zu einer Interaktion ihrer zytoplasmatischen Bereiche und damit zur Auslösung der Signalkaskade. IL-6-Typ Zytokine nutzen zur intrazellulären Signalweiterleitung zum einen den JAK/STAT (Janus Kinase/*signal transducer and activator of transcription*)-Weg und zum anderen die MAPK-Kaskade. Um eine unkontrollierte Aktivierung von Zellen zu vermeiden, ist es letztlich von Nöten, die einmal gestartete Signaltransduktion z.B. durch SOCS- (*suppressors of cytokine signalling*) oder PIAS-Proteine (*protein inhibitors of activated STATs*) auch wieder abzuschalten.

I.3.1 Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg

Da die Zytokinrezeptoren im Gegensatz zu den Rezeptoren der Wachstumsfaktoren wie z.B. dem EGFR oder dem PDGFR keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzen um das Signal weiterzuleiten, interagieren sie mit zytoplasmatischen Tyrosinkinasen der Janus-Familie. Diese haben eine molare Masse von 120 bis 140 kDa und sind konstitutiv an den Rezeptor im Box1/2-Bereich assoziiert (40-43). Die Familie der Janus Kinasen besteht bei Säugetieren aus vier Mitgliedern: JAK1 (44), JAK2 (45), JAK3 (46) und TYK2 (47). Die Janus Kinasen treten mit Ausnahme von JAK3, die vor allem in myeloiden und lymphoiden Zellen exprimiert wird, ubiquitär auf. Die weit verbreitete Expression dieser Kinasen zeigt, dass sie von großer Bedeutung für die Signaltransduktion vieler Zytokine sind. Mutationen würden zum Verlust wichtiger signalweiterleitender Funktionen führen und sind deshalb selten zu beobachten.

Betrachtet man die Struktur der Janus Kinasen wird klar, weshalb für diese Proteine in Anlehnung an die römische Mythologie der Name des doppelgesichtigen Gottes Janus gewählt wurde (48): sie besitzen zwei Kinase-Domänen (JH1 und JH2). Nur die C-terminal gelegene JH1 weist auch Kinaseaktivität auf. Soweit bislang analysiert, liegen die beiden Tyrosinreste der

Aktivierungsschleife im aktivierten Zustand phosphoryliert vor. In der JH2-Domäne sind wichtige zur Katalyse notwendige Aminosäuren mutiert, sodass sie enzymatisch inaktiv ist und daher den Namen Pseudokinase-Domäne trägt (Abb.2). Ihr werden aber sowohl positiv als auch negativ regulatorische Eigenschaften zugeschrieben (49-51). Strukturvorhersagen postulieren für die sich an die Pseudokinase-Domäne N-terminal anschließende Region eindeutig eine SH2-Domäne, die aber nicht als klassische SH2-Domäne fungiert. Die N-terminalen Domänen JH4-JH7 nehmen wahrscheinlich die Struktur einer FERM-Domäne ein und sind für die Rezeptor-Interaktion essentiell (52). Die Bezeichnung FERM geht auf die vier Proteine *band four-point-one protein*, Ezrin, Radixin und Moesin zurück, die alle ebenfalls diese Domäne besitzen, die sich in drei Subdomänen F1, F2 und F3 gliedert.

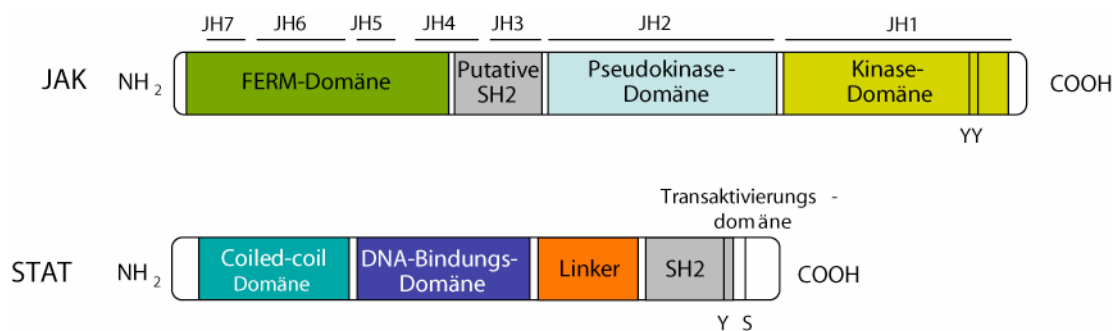


Abb.2: Domänenstruktur von JAK und STAT

Während sich STATs durch den Besitz einer SH2-Domäne auszeichnen, die bei Phosphorylierungsvorgängen von entscheidender Bedeutung ist, konnte die Existenz einer entsprechenden Domäne für JAKs zwar in Strukturvorhersagen beschrieben, ihr aber keine klassische SH2-Funktion zugeordnet werden. Wichtige Tyrosine (Y) in JAK und STAT, bzw. das Serin (S) im Transaktivierungsbereich von STAT sind eingezeichnet.

Eine der wichtigsten Aufgaben der Zytokinrezeptorketten ist es, die mit ihnen assoziierten Janus Kinasen nach zytokininduzierter Rezeptordimerisierung in die für die JAK-Aktivierung essentielle räumliche Nähe zu bringen (48,53). Während für JAK1, JAK2 und TYK2 eine konstitutive Assoziation mit gp130 und dem LIFR nachgewiesen wurde (40), konnte für den OSMR bislang nur die Assoziation mit JAK1 und JAK2 nachgewiesen werden (54). Die Aktivität von JAK1 ist dabei insbesondere für IL-6-abhängige Signalprozesse essentiell (55,56). In verschiedenen Untersuchungen konnten neben der Aktivierung von Janus

Kinasen weitere Proteintyrosinkinasen identifiziert werden, die gp130-abhängig aktiviert werden. Dazu gehören zum Beispiel Btk, Tec (57) und Fes (58). Die membranproximale Box1/Box2-Region der signaltransduzierenden Zytokinrezeptoren spielt für die Bindung der JAKs eine wichtige Rolle. Während sich die prolinreiche Box1-Region durch das hochkonservierte Prolin-X-X-Prolin-X-Prolin-Motiv auszeichnet, ist die Box2-Region durch eine Ansammlung von hydrophoben, gefolgt von positiv geladenen Aminosäuren gekennzeichnet. Durch die Rezeptordimerisierung werden die Janus Kinasen aktiviert und sehr wahrscheinlich autophosphoryliert, sodass sie ihrerseits für die Phosphorylierung von membrandistalen Tyrosinresten des Rezeptors sorgen. Erst in den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Janus Kinasen neben ihrer Rolle als Tyrosinkinasen in der Signaltransduktion auch eine wichtige Rolle für die Oberflächenexpression von Rezeptoren spielen (59-62).

Nach ihrer Phosphorylierung stellen die Tyrosinreste im Rezeptor Rekrutierungsstellen für Proteine mit SH2-Domänen dar. Für die IL-6-Typ Zytokine sind die sogenannten STAT-Faktoren (Abb.2) (63,64) und die Tyrosinphosphatase SHP2 (65) von besonderer Bedeutung. Bislang sind sieben STAT-Moleküle mit molaren Massen zwischen 75 und 91 kDa bekannt: STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b und 6. Ihre konservierte Domänenorganisation gliedert sich vom N- zum C-Terminus in eine *coiled-coil*-Domäne, eine DNA-Bindungsdomäne, eine SH2- und eine Transaktivierungsdomäne (66). Im Fall der IL-6-Typ Zytokine wird in besonderem Maße eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT3 (ursprünglich als *acute phase response factor* (APRF) beschriebener STAT-Faktor (40,67)) und STAT1 beobachtet. So können die vier membrandistalen Tyrosine im gp130 Y₇₆₇, Y₈₁₄, Y₉₀₅ und Y₉₁₅ STAT3 und die zwei Tyrosine Y₉₀₅ und Y₉₁₅ zusätzlich noch STAT1 rekrutieren (Abb.3) (63,64). Der OSMR ist ebenfalls dazu befähigt, STAT1 und STAT3 zu aktivieren (54,68), wobei der genaue Mechanismus noch ungeklärt ist. Vieles deutet jedoch darauf hin, dass die Box1/2-Region im OSMR zur Aktivierung von STAT1 ausreicht. Für STAT3 wird eine Rekrutierung an die Tyrosinmotive Y₉₁₇ und Y₉₄₅ des OSMR postuliert (Abb.3). Zusätzlich zeigt die OSM-vermittelte Signaltransduktion eine Aktivierung von STAT5 (69). Auch hier ist noch nicht geklärt, welche Tyrosine im einzelnen eine Rekrutierung bewirken.

Durch die Phosphorylierung eines im C-terminalen Bereich gelegenen Tyrosinrestes (Y_{705} bei STAT3 (70); Y_{701} bei STAT1 (71) und Y_{694} bei STAT5) erfolgt die Aktivierung und damit die Dimerisierung der STATs. Die SH2-Domänen, mit denen die STATs vor ihrer Aktivierung an die Phosphotyrosinreste der aktivierten Rezeptoren gp130, LIFR oder OSMR gebunden waren, sind für diese Dimerisierung verantwortlich.

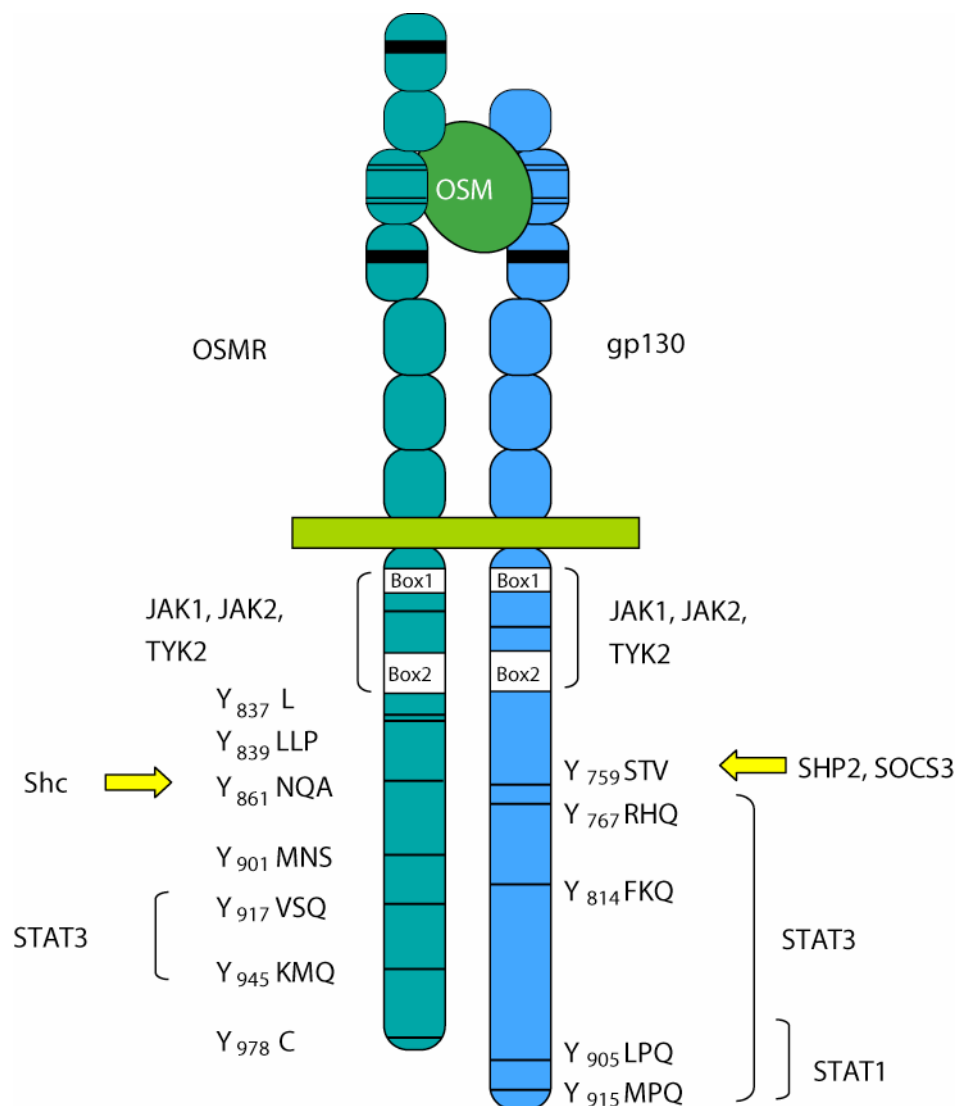


Abb.3: Der OSMR/gp130-Rezeptorkomplex – Ausgangspunkt verschiedenster Signaltransduktionswege

Nach OSM-induzierter Rezeptordimerisierung kommt es durch aktivierte STAT-Faktoren oder durch die über die Adaptermoleküle Shc bzw. SHP2 aktivierte Ras/Raf/MAPK-Kaskade zur Signalweiterleitung, die letztlich zur Regulation OSM-responsiver Gene führt.

So können STAT-Faktoren Homo- oder Heterodimere bilden und in den Zellkern translozieren.

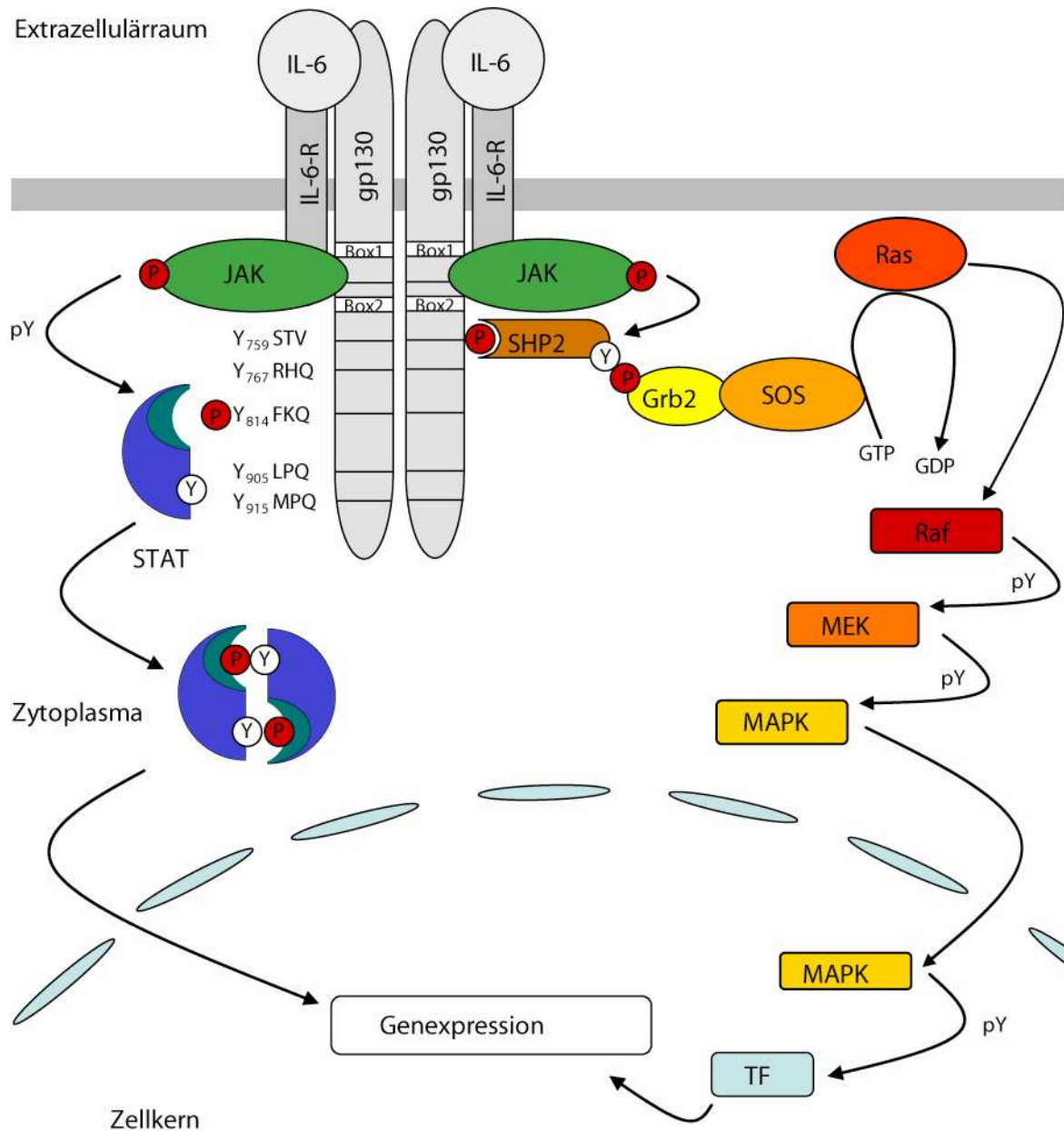


Abb.4: Zwei verschiedene Wege der IL-6-induzierten Signaltransduktion

Nach ligandeninduzierter Bildung eines aktivierten Rezeptorkomplexes, beispielsweise aus zwei IL-6R-Ketten und einem gp130-Homodimer, kann auf mindestens zwei Wegen eine Signaltransduktion erfolgen. Zum einen werden über die Janus Kinasen STAT-Transkriptionsfaktoren aktiviert, die in den Zellkern translozieren und dort die Expression IL-6-responsiver Gene regulieren. Zum anderen kann über die an Phosphotyrosinreste im zytoplasmatischen Rezeptorbereich bindende Tyrosinphosphatase SHP2 der Ras/Raf/MAPK-Weg angeschaltet werden, der ebenfalls zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt.

Dort binden sie an Promotor- und *enhancer*-Elemente verschiedener Zielgene und beeinflussen deren Transkriptionsrate. Zusätzlich zur Tyrosinphosphorylierung wurde für die Transaktivierung der STAT-Faktoren auch eine Serinphosphorylierung beschrieben (72-74). Diese kann sich auch hemmend auf die STAT-DNA-Bindung und die transkriptionelle Aktivität auswirken (75).

I.3.2 Der Ras/Raf/MAPK-Signalweg

Neben dem JAK/STAT-Signalweg aktivieren die IL-6-Typ Zytokine auch den Ras/Raf/MAPK-Signalweg (Abb.4). Ein erster notwendiger Schritt ist die Rekrutierung der Phosphatase SHP2, die hier durch Bindung ihrer SH2-Domänen an die aktivierten Rezeptoren gp130 oder LIFR eine Adapterfunktion ausübt (76,77). Stimulationsabhängig wird SHP2 selbst tyrosinphosphoryliert und bietet so am aktivierten Rezeptor Bindungsstellen für das Adapterprotein Grb2 (*growth factor receptor bound protein-2*). Ohne eigene katalytische Funktion, dafür aber mit einer SH2- und zwei SH3-Domänen ausgestattet (76), rekrutiert Grb2 über eine dieser SH3-Domänen seinerseits den Guaninnukleotid-Austausch-Faktor SOS (*son of sevenless*). Dies führt zu einer Translokation dieses Proteins vom Zytoplasma an die Zellmembran (56). Als Nukleotid-Austausch-Faktor aktiviert SOS den Austausch der inaktiven GDP-gebundenen Form von Ras durch die GTP-gebundene aktive Form. Daraus resultiert, dass Ras seinerseits mit der Serin/Threonin-Kinase Raf (78) assoziiert, die nach ihrer Aktivierung als übergeordnete Kinase für die dualspezifische Kinase MEK dient. Über eine Tyrosin-/Threoninphosphorylierung aktiviert MEK MAP-Kinasen, die anschließend verschiedene Transkriptionsfaktoren (TF) modifizieren (79) (Abb.4).

Der OSMR ist nicht in der Lage SHP2 zu binden. Stattdessen rekrutiert er das Adapterprotein Shc, das an den Tyrosinrest Y₈₆₁ bindet und im Folgenden über einen SHP2/Grb2/SOS analogen Weg die Ras/Raf/MAPK-Kaskade aktiviert (80). Im Gegensatz zu IL-6 oder LIF ist OSM über diesen Signalweg nicht nur zu einer starken Aktivierung von ERK1/2 befähigt, sondern führt auch zu einer Phosphorylierung der stressaktivierten MAPK p38 und JNK (81). Der genaue Mechanismus der Aktivierung stressaktivierter MAPK ist noch nicht geklärt.

Im IL-6-induzierten MAPK-Signalweg ist außerdem eine Beteiligung des Adapter-Proteins Gab1 beschrieben worden (77).

I.3.3 Regulationsmechanismen zytokininduzierter Signalkaskaden

Um eine unkontrollierte Aktivierung von Zellen zu vermeiden, ist es unerlässlich, eine einmal gestartete Signaltransduktion auch wieder abschalten zu können.

Die Familie der SOCS-Proteine (*suppressors of cytokine signalling*) spielt eine wichtige Rolle für die Abschaltung von IL-6-Typ Zytokin-induzierten Signaltransduktionskaskaden. Zur Zeit sind acht Familienmitglieder bekannt: CIS und SOCS1-7. Sie werden zum Teil nach einer Zytokin-Stimulation verstärkt exprimiert und wirken dann als *feed-back*-Inhibitoren (82-84). Betrachtet man die Domänenstruktur von SOCS-Proteinen, erkennt man, dass sich eine *extended SH2 subdomain* N-terminal an die zentrale SH2-Domäne anschließt und deren Funktion bei der Bindung von Phosphotyrosinmotiven im Aktivierungsloop von Janus Kinasen unterstützt (85,86). Sie ist somit unabdingbar für die hemmende Wirkung der Proteine. Die KIR (*kinase inhibitory region*) ist ihrerseits essentiell für die Hemmung der Janus Kinasen, da postuliert wird, dass diese Region als Pseudosubstrat in die Substratbindungstasche der JAKs bindet und die Kinase dadurch inhibiert (86). Ebenso wie die KIR- und ESS-Domänen ist auch die C-terminal gelegene SOCS-Box sehr wichtig für die hemmende Wirkung von SOCS-Proteinen (87). Durch Interaktion der SOCS-Box mit ElonginC kommt es zur Ausbildung eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, der zur Ubiquitinierung der SOCS-Substrate und so zu deren Abbau im Proteasom führt (88-91).

SOCS3 wurde in Überexpressionssystemen aber auch *in vivo* als potenter Inhibitor des IL-6-Signalweges identifiziert (82,83). Der *feedback*-Inhibitor SOCS3 ist ebenso dazu befähigt, ein OSM vermitteltes Signal abzuschalten, indem er an den Tyrosinrest Y₇₅₉ des gp130 bindet. Eine direkte Interaktion von SOCS3 mit dem OSMR kann allerdings ausgeschlossen werden. Vielmehr übt SOCS3 seine inhibitorische Funktion hier über eine direkte Interaktion mit JAK1 aus (92).

Neben den SOCS-Proteinen können auch die *protein inhibitors of activated STATs* (PIAS) negativ auf eine zytokininduzierte Signaltransduktion wirken. Sie erkennen

und binden phosphorylierte STAT-Faktoren (93,94). Der genaue Inhibitionsmechanismus ist hier aber noch nicht eindeutig geklärt.

Ein anderer Weg Signale abzuschalten ist die Dephosphorylierung von Proteinen. Neben ihrer Funktion als Adapterprotein ist die Tyrosinphosphatase SHP2 mit Hilfe ihrer Phosphatase-Enzymaktivität nach Anlagerung an den Tyrosinrest Y₇₅₉ des gp130 in der Lage, IL-6- und OSM-vermittelte Signale negativ zu regulieren (95,96).

I.4 OSM induziert die Expression von Chemokinen

OSM wird hauptsächlich von aktivierten T-Lymphozyten, Makrophagen und polymorphkernigen Neutrophilen produziert. Seine Bedeutung für die Regulation der Expression der Akutphase-Proteine, für die Proliferation und Differenzierung von zum Beispiel Endothelzellen oder Fibroblasten oder für die Wundheilung ist unumstritten. Die entzündungsregulierenden Funktionen von OSM werden kontrovers diskutiert, da sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden konnten. Inflammatorische Prozesse kann OSM unter anderem über einen, für IL-6-Typ Zytokine bislang wenig erforschten Weg, nämlich die verstärkte Expression von Chemokinen, einleiten.

Der Terminus „Chemokine“ bezeichnet eine Gruppe von derzeit ungefähr 50 humanen chemotaktischen Zytokinen mit molaren Massen von 8 – 12 kDa (97). Ursprünglich kannte man Chemokine als chemotaktische Mediatoren, die im Falle von Entzündungen Leukozyten rekrutieren. Heute weiß man, dass sie weitaus mehr Funktionen erfüllen. So können sie als regulatorische Moleküle bei der Reifung von Leukozyten wirken, die Entwicklung lymphoider Gewebe beeinflussen, sind aber auch für das sogenannte „*homing*“ der Lymphozyten verantwortlich (98-100).

Strukturell lassen sich die über sensitive G-Proteine signalisierenden Chemokine, je nach Lage ihrer N-terminalen Cysteinreste, in die zwei großen Klassen der CC- und CXC-Chemokine einteilen (101). Im Hinblick auf die Einordnung der vorliegenden Dissertation, erscheint aber eine andere Einteilung sinnvoller. Hierbei differenziert man zwischen inflammatorischen und „*homing*“ Chemokinen

(102). Während sich die inflammatorischen Chemokine durch eine hohe Redundanz auszeichnen und vor allem von Gewebezellen und von infiltrierenden Leukozyten nur unter pathologischen Bedingungen gebildet werden, zeichnen sich die „*homing*“ Chemokine durch eine konstitutive Expression aus und interagieren zum Beispiel ständig mit ihren Rezeptoren auf der Oberfläche von Lymphozyten (103-105). Wie das zuerst entdeckte Chemokin IL-8 (CXCL8) gehört auch die Familie der *monocyte chemoattractant proteins* (MCP-1 – 4) und das weitgehend unbekannte Chemokin I-309 (CCL1) zu den inflammatorischen Chemokinen (102). Diese Chemokine rekrutieren verschiedene Zellen des Immunsystems über ein koordiniertes Zusammenspiel mit Selektinen und Integrinen (106). MCP-1 – 4 sind seit der neu beschlossenen Chemokinnomenklatur auch als CCL2, -8, -7 und -13, I-309 als CCL1 bekannt (107,108). Wie der Name der *monocyte chemoattractant proteins* verrät, sind sie - wie auch CCL1 - für die Rekrutierung von Monozyten von besonderer Bedeutung, die dann im Gewebe zu Makrophagen differenzieren (109,110). T-Lymphozyten zählen dagegen vor allem zu den Zielzellen von CCL1, während basophile Zellen von allen vier MCP-Proteinen rekrutiert werden (106,111). CCL7 und CCL13 wirken zusätzlich auch auf eosinophile und dendritische Zellen ein. Zur Rekrutierung neutrophiler Zellen sind die hier beschriebenen Chemokine nach dem derzeitigen Stand der Forschung nicht befähigt (101).

Über einen Zusammenhang zwischen OSM oder anderen IL-6-Typ Zytokinen und der verstärkten Expression von CCL1, CCL7, CCL8 und CCL13 ist bislang wenig bekannt. Einzelne Veröffentlichungen zeigen auf, dass OSM die Fähigkeit besitzt, sowohl die Expression von CCL2 als auch die der Chemokine SDF-1 (*stromal-derived factor-1*; CXCL12) und Eotaxin (CCL11) zu induzieren (112-117). Darüber hinaus legen zusätzlich verschiedenste Publikationen eine Rekrutierung von Leukozyten nach OSM-Stimulation nahe (118-120), die möglicherweise nicht nur über die bereits publizierten Chemokine, sondern auch über eine OSM-induzierte Expression von CCL1, CCL7, CCL8 und CCL13 sowie weiteren Chemokinen reguliert wird.

I.5 Die Bedeutung von OSM in der antiviralen Immunabwehr

Viren vermehren sich obligat in Zellen. Oftmals erfolgen Virusinfektionen über Schleimhäute oder über das Blut. Dabei werden normale Oberflächenstrukturen von Zellen als Rezeptoren benutzt.

Die primäre, unspezifische Antwort des Immunsystems auf eine Infektion ist angeboren. Im ersten Schritt bilden infizierte Zellen virostatisch wirkende Interferone, die eine Begrenzung von Replikation und Ausbreitung der Viren bewirken und zusätzlich zur Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) befähigt sind, die ihrerseits virusinfizierte Zellen erkennen und zerstören. Darüberhinaus ausgeschüttete proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, TNF α und IL-12 sowie das Mitwirken von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ermöglichen den Übergang zur adaptiven Immunantwort, einem selektiv wirkenden, antigenspezifischen System.

Damit die zuvor beschriebene antivirale Immunantwort eines Organismus anlaufen kann, muss eine infizierte Zelle virusassoziierte Moleküle, sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) erkennen. Neben genomischer DNA sowie einzelsträngiger und doppelsträngiger RNA zählen hierzu auch virale Glycoproteine. Alle diese virusspezifischen Determinanten können durch spezielle Rezeptoren der Wirtszelle erkannt werden. Zu diesen auch als *pattern-recognition receptors* (PRRs) bezeichneten Rezeptoren gehört sowohl die aus zehn Mitgliedern bestehende Familie der *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) als auch die erst kürzlich entdeckten *RIG-I-like* Rezeptoren (RLR). Für die Erkennung viraler Nucleinsäuren sind vor allem TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sowie die beiden zytoplasmatischen DExD/H-Box Helikasen RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) und MDA5 (*melanoma differentiation-associated antigen 5*) verantwortlich (121,122). Nach der Bindung eines Liganden vermitteln diese Rezeptoren über diverse Signaltransduktionswege die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Interferonen.

Zu den wichtigsten freigesetzten proinflammatorischen Zytokinen gehört IL-6, das wie auch IL-1 und TNF α zu den Pyrogenen zählt und dessen Funktion bei der

antiviralen Immunabwehr klar von der der Interferone abgegrenzt ist. Obwohl IL-6 kurz nach seiner Entdeckung auch als Interferon β 2 bezeichnet wurde und man interferonähnliche Eigenschaften postulierte (123-125), wurde kurze Zeit später belegt, dass IL-6 keine antivirale Potenz besitzt und demnach nicht zu den Interferonen zu zählen ist (126,127). Dies gilt auch für die übrigen IL-6-Typ Zytokine, wenngleich Studien belegen, dass sowohl OSM, als auch IL-27 interferonähnliche Mechanismen in der Signaltransduktion nutzen, die vor allem in einer verstärkten STAT1-Aktivierung Ausdruck finden. Lediglich für OSM wurde jedoch gezeigt, dass es auch die Transkription vereinzelter, klassischer IFN-responsiver Gene induzieren kann (128) und somit möglicherweise an der direkten antiviralen Immunantwort beteiligt ist. Der Nachweis, dass diese induzierten Gene tatsächlich exprimiert werden und darüber hinaus auch noch eine physiologische Relevanz besitzen, wurde jedoch bisher nicht erbracht.

I.6 Ziel der Arbeit

Eine Besonderheit der OSM-vermittelten Signaltransduktion ist die Aktivierung von STAT5. Innerhalb der IL-6-Typ Zytokine stellt Oncostatin M institutsinternen Ergebnissen zur Folge den stärksten STAT5-Aktivator dar.

Mit Hilfe eines bereits etablierten chimären IL-5-Rezeptorsystems sollte im ersten Teil dieser Arbeit der Nachweis geführt werden, welche Rezeptorkette und welche der in ihr enthaltenen Tyrosinmotive zur OSM-induzierten STAT5-Aktivierung beitragen. JAK1-, JAK2-, und TYK2-defiziente Fibrosarcomzellen sollten die Bedeutung der einzelnen Janus Kinasen in diesem Zusammenhang näher beleuchten. Mit dem Fortgang der Arbeit wurde schnell deutlich, dass auch ein Vergleich der OSM-abhängigen STAT5 Aktivierung im humanen und murinen System nötig war.

Aufgrund einer Kollaboration mit dem Labor von Dr. Ian M. Kerr am *London Research Institute, Cancer Research UK* konnte das OSM-induzierte Genexpressionsprofil zu verschiedenen Zeitpunkten in humanen dermalen Fibroblasten mit Affymetrix-Mikroarrays charakterisiert werden. Über 400 Gene wurden stärker als

dreifach in ihrer Transkription verändert. Darunter befindet sich auch die Familie der *monocyte-chemoattractant proteins* (CCL2, -7, -8). Andere aktuelle Ergebnisse zeigten, dass in humanen Synovial- und Lungenfibroblasten nach Stimulation mit OSM eine Induktion von CCL2 und Eotaxin nachgewiesen werden konnte (114,129).

Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass Chemokine während der Entzündungsreaktion zur Rekrutierung inflammatorischer Zellen eine entscheidende Rolle spielen, sollten im zweiten und dritten Teil dieser Arbeit die Affymetrix-Mikroarray Daten nach Etablierung eines *RNase Protection Assays* (RPA) auf mRNA- und später auch auf Proteinebene bestätigt werden. Die im Folgenden erhaltenen Resultate verschiedener RPAs bestätigten nicht nur die verstärkte Transkription der *monocyte-chemoattractant proteins* CCL2, -7, -8, sondern legten auch die OSM-induzierte Transkription verschiedenster anderer Chemokine dar. Dazu zählten unter anderem MCP-4 (CCL13) und I-309 (CCL1), die im weiteren Verlauf der Arbeit neben CCL2, CCL7 und CCL8 Gegenstand intensiver Forschungsarbeit wurden. Da über die von OSM initiierten Signalkaskaden, die zur Expression der diversen Chemokine führen, wenig bekannt war, sollten diese mit Hilfe diverser siRNA *knock-downs* und mit dem Einsatz verschiedener chemischer Inhibitoren näher beleuchtet werden. Im weiteren Verlauf galt es dann, die physiologische Relevanz der induzierten Gene zu ermitteln und zu zeigen, dass die exprimierten Chemokine die Rekrutierung von Leukozyten vermitteln.

Neben den Chemokinen befanden sich auch die beiden DExD/H-Box Helikasen RIG-I und MDA5 unter den über 400 durch OSM-regulierten Genen, die im Affymetrix-Mikroarray auffindig gemacht werden konnten. Gerade in der jüngeren Vergangenheit gewannen diese Proteine immer wieder neue Aufmerksamkeit, da nachgewiesen werden konnte, dass sie als zytoplasmatische Rezeptoren für virale RNA in entscheidendem Maße an der Initiation der antiviralen Immunabwehr beteiligt sind.

Im letzten Teil der Arbeit sollte mit verschiedenen siRNA *knock-downs* untersucht werden, über welche Signalwege Oncostatin M die Expression dieser Helikasen induziert. Mit Hilfe von antiviralen assays und Experimenten, in denen das VSV

(vesicular stomatitis virus) –Matrixprotein überexprimiert wurde, sollte aufgeklärt werden, ob OSM als bislang einziges IL-6-Typ Zytokin befähigt ist, interferon-ähnlich in einer antiviralen Immunantwort zu agieren.

II. Material und Methoden

II.1 Materialien

II.1.1 Chemikalien

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

Radiochemikalien

[$\alpha^{32}\text{P}$] -UTP (Hartmann, Braunschweig)

Inhibitoren

JAK Inhibitor 1	(Calbiochem, Darmstadt)
AG490	(Calbiochem, Darmstadt)
U0126	(Promega, Madison, USA)
SP600125	(Calbiochem, Darmstadt)
SB202190	(Calbiochem, Darmstadt)
BIM	(Sigma, Taufkirchen)

II.1.2 Puffer und Medien

Alle Puffer und Medien wurden in wässriger Lösung (Qualität Millipore) angesetzt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer wird in der Methodenbeschreibung näher erläutert.

II.1.3 Verbrauchsmaterialien

Das eingesetzte Verbrauchsmaterial wurde von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Millipore (Schwalbach), Serva (Heidelberg), Renner (Darmstadt), Sarstedt (Nümbrecht), Corning Costar (Bodenheim) und Whatman (Frickenhausen) bezogen.

II.1.4 Reaktionskits

Folgende Reaktionskits wurden gemäß Herstellerangaben eingesetzt:

Mini-Plasmidpräparationskit	(Qiagen, Hilden)
Maxi-Plasmidpräparationskit	(Qiagen, Hilden)
Qiaquick-Gel-Extraktionskit	(Qiagen, Hilden)
RNeasy Mini RNA-Isolationskit	(Qiagen, Hilden)
Qiashredder™	(Qiagen, Hilden)
OneStep RT-PCR kit	(Qiagen, Hilden)
QuickChange site directed mutagenesis kit	(Stratagene, La Jolla, USA)
Dynal® Monocyte Negative Isolation kit	(Invitrogen, Karlsruhe)
Dynal® T Cell Negative Isolation kit	(Invitrogen, Karlsruhe)

II.1.5 Enzyme

Folgende Enzyme wurden gemäß Herstellerangaben eingesetzt:

T4-DNA-Ligase	(Roche, Mannheim)
Taq DNA-Polymerase	(Hybaid, Heidelberg)
Alkalische Phosphatase	(Roche, Mannheim)

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Hybaid (Heidelberg), Roche (Mannheim) und New England BioLabs (Frankfurt/Main) bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

II.1.6 Zytokine und Rezeptoren

IL-1	rekombinantes, humanes Interleukin-1; wurde von der Firma Cell Concepts (Umkirch) bezogen und besaß eine spezifische Aktivität von 2×10^7 U/mg Protein.
IL-5	rekombinantes, humanes Interleukin-5; wurde von der Firma Cell Concepts (Umkirch) bezogen und besaß eine spezifische Aktivität von 6×10^6 U/mg Protein.
IL-6	humanes Interleukin-6; wurde nach der Methode von Arcone <i>et al.</i> (130) rekombinant hergestellt und freundlicherweise von A. Küster und B. Mütze zur Verfügung gestellt; die spezifische Aktivität betrug 2×10^6 BSF2 (<i>B-cell stimulatory factor-2</i>) U/mg Protein.
sIL-6R	löslicher, humaner IL-6-Rezeptor; wurde nach der Methode von Weiergräber <i>et al.</i> (131) hergestellt und freundlicherweise von A. Küster und M. Kauffmann zur Verfügung gestellt.
OSM	rekombinantes, humanes Oncostatin M; wurde von der Firma Cell Concepts (Umkirch) bezogen und besaß eine spezifische Aktivität von $> 5 \times 10^5$ U/mg Protein.
muOSM	rekombinantes, murines OSM; wurde von der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) bezogen und besaß eine spezifische Aktivität von 5×10^6 U/mg Protein.
LIF	rekombinanter, humaner <i>leukemia inhibitory factor</i> ; wurde von der Firma Sigma (Taufkirchen) bezogen und besaß eine spezifische Aktivität von 1×10^8 U/mg Protein.

TNF α	rekombinanter, humaner <i>tumor necrosis factor α</i> ; wurde von der Firma Sigma (Taufkirchen) bezogen und besaß eine spezifische Aktivität von $2,5 \times 10^7$ U/mg Protein.
IFN α	rekombinantes, humanes Interferon α ; wurde von der Firma Cell Concepts (Umkirch) bezogen und besaß eine spezifische Aktivität von 2×10^7 U/mg Protein.
IFN β	rekombinantes, humanes Interferon β ; wurde von der Firma Cell Concepts (Umkirch) bezogen und besaß eine spezifische Aktivität von 2×10^7 U/mg Protein.
IFN γ	rekombinantes, humanes Interferon γ ; wurde von der Firma Cell Concepts (Umkirch) bezogen und besaß eine spezifische Aktivität von 2×10^7 U/mg Protein.
MCP-1	rekombinantes, humanes <i>monocyte chemotactic protein 1</i> ; wurde von der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) bezogen.
MCP-2	rekombinantes, humanes <i>monocyte chemotactic protein 2</i> ; wurde von der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) bezogen.
MCP-4	rekombinantes, humanes <i>monocyte chemotactic protein 4</i> ; wurde von der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) bezogen.
I-309	rekombinantes, humanes I-309; wurde von der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) bezogen.

II.1.7 Antikörper

Kaninchen-anti-Maus Ig	polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich des Maus-Immunglobulins; HRP-konjugiert (DAKO, Hamburg)
Ziege-anti-Kaninchen Ig	polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich des Kaninchen-Immunglobulins; HRP-konjugiert (DAKO, Hamburg)
Kaninchen-anti-Ziege Ig	polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich des Ziegen-Immunglobulins; HRP-konjugiert (DAKO, Hamburg)
PE-Ziege-anti-Maus IgG Fab	polyklonales Antiserum gegen Maus IgG Fab-Fragmente, R-Phycoerythrin-konjugiert (Dianova, Hamburg)
Anti-IL-5R β (N-20)	polyklonales Antiserum gegen den extrazellulären Bereich der gemeinsamen signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit von IL-3/IL-5/GM-CSF (Santa Cruz, Heidelberg)
Anti-IL-5R β (S-16)	monoklonaler Antikörper gegen den extrazellulären Bereich der gemeinsamen signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit von IL-3/IL-5/GM-CSF (Santa Cruz, Heidelberg)
Anti-IL-5R α	monoklonaler Antikörper gegen den extrazellulären Bereich der α -Kette des humanen IL-5-Rezeptors (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. J. Tavernier, Gent)
Anti-LIFR (C-19)	polyklonales Antiserum gegen den extrazellulären Bereich der signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit von LIFR (Santa Cruz, Heidelberg)

Anti-OSMR β (AN-A2)	monoklonaler Antikörper gegen den extrazellulären Bereich der signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit von OSMR (Santa Cruz, Heidelberg)
Anti-Calnexin (C-20)	monoklonaler Antikörper gegen Calnexin (Santa Cruz, Heidelberg)
Anti-Lamin A/C (346)	monoklonaler Antikörper gegen Lamin (Santa Cruz, Heidelberg)
Anti-ERK1/2	monoklonaler Antikörper gegen die Serin/Threonin-Kinasen ERK1 und ERK2 (Cell Signaling, Frankfurt)
Anti-ERK1/2 (T ₂₀₂ /Y ₂₀₄)	polyklonales Antiserum gegen die aktive Form der Kinasen ERK1/ERK2, phosphoryliert an Threonin T ₂₀₂ und Tyrosin Y ₂₀₄ (Cell Signaling, Frankfurt)
Anti-p38 (T ₁₈₀ /Y ₁₈₂)	monoklonaler Antikörper gegen die aktive Form der Kinase p38, phosphoryliert an Threonin T ₁₈₀ und Tyrosin Y ₁₈₂ (Cell Signaling, Frankfurt)
Anti-p38	polyklonales Antiserum gegen die Serin/Threonin-Kinase p38 (Cell Signaling, Frankfurt)
Anti-MK2 (T ₂₂₂)	polyklonaler Antikörper gegen die aktive Form der Kinase MK2, phosphoryliert an Threonin T ₂₂₂ (Cell Signaling, Frankfurt)
Anti-MK2	polyklonaler Antikörper gegen die Kinase MK2
Anti-JNK1/2 (T ₁₈₃ /Y ₁₈₅)	polyklonales Antiserum gegen die aktive Form der Kinasen JNK1 und JNK2, phosphoryliert an Threonin T ₁₈₃ und Tyrosin Y ₁₈₅ (Cell Signaling, Frankfurt)
Anti-JNK1/2	polyklonaler Antikörper gegen die Kinasen JNK1 und JNK2 (Cell Signaling, Frankfurt)
Anti-STAT1 (C-136)	monoklonaler Antikörper gegen STAT1 (Transduction Laboratories, USA)
Anti-STAT1 (Y ₇₀₁)	polyklonales Antiserum gegen die tyrosinphosphorylierte Form des Transkriptionsfaktors STAT1 (Cell Signaling, Frankfurt)
Anti-STAT1 (S ₇₂₇)	polyklonales Antiserum gegen die serinphosphorylierte Form des Transkriptionsfaktors STAT1 (Upstate, USA)
Anti-STAT3 (F-2)	monoklonaler Antikörper gegen den N-terminalen Bereich des Transkriptionsfaktors STAT3 (Transduction Laboratories, USA)
Anti-STAT3 (Y ₇₀₅)	monoklonaler Antikörper gegen die aktive Form des Transkriptionsfaktors STAT3, phosphoryliert an Tyrosin Y ₇₀₅ (Cell Signaling, Frankfurt)
Anti-STAT5b (G-2)	polyklonales Antiserum gegen STAT5b (Santa Cruz, Heidelberg)
Anti-STAT5 (Y ₆₉₄)	polyklonales Antiserum gegen die tyrosinphosphorylierte Form des Transkriptionsfaktors STAT5 (Cell Signaling, Frankfurt)
Anti-JAK1 (HR-785)	polyklonales Antiserum gegen den C-terminalen Bereich der Janus Kinase JAK1 (Santa Cruz, Heidelberg)

Anti-JAK1 (Y ₁₀₂₂ /Y ₁₀₂₃)	polyklonaler Antikörper gegen die doppelt tyrosinphosphorylierte Form der Janus Kinase JAK1 (Cell Signaling, Frankfurt)
Anti-JAK2 (C-20)	polyklonales Antiserum gegen den C-terminalen Bereich der Janus Kinase JAK2 (Santa Cruz, Heidelberg)
Anti-JAK2 (Y ₁₀₀₇ /Y ₁₀₀₈)	polyklonaler Antikörper gegen die doppelt tyrosinphosphorylierte Form der Janus Kinase JAK2 (Cell Signaling, Frankfurt)
Anti-IRF1 (C-20)	polyklonales Antiserum gegen den C-terminalen Bereich des <i>interferon regulatory factor-1</i> (Santa Cruz, Heidelberg)
Anti-IRF3 (FL-425)	polyklonales Antiserum gegen den C-terminalen Bereich des <i>interferon regulatory factor-3</i> (Santa Cruz, Heidelberg)
Anti-IRF3 (S ₃₉₆)	monoklonales Antiserum gegen die serinphosphorylierte Form des <i>interferon regulatory factor-3</i> (Cell Signaling, Frankfurt)
Anti-SOCS3 (M-20)	polyklonales Antiserum gegen den C-terminalen Bereich von SOCS3 (Santa Cruz, Heidelberg)
Anti-c-Fos	polyklonales Antiserum gegen den Transkriptionsfaktor c-Fos (Cell Signaling, Frankfurt)
Anti-c-Jun	polyklonaler Antikörper gegen den Transkriptionsfaktor c-Jun (Santa Cruz, Heidelberg)
Anti-GBP2 (N-17)	polyklonales Antiserum gegen den C-terminalen Bereich von GBP2 (Santa Cruz, Heidelberg)
Anti-RIG-I	polyklonales Antiserum gegen die DExD/H-Box-Helikase RIG-I (<i>retinoic acid inducible gene-1</i>) (ProSci, Poway, USA)
Anti-MDA5	polyklonales Antiserum gegen die DExD/H-Box-Helikase MDA-5 (<i>melanoma differentiation associated gene-5</i>) (Abcam, Cambridge, UK)
Anti-MCP-1 (MAB679)	monoklonales Antiserum gegen das Chemokin MCP-1 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
Anti-MCP-1 (BAF679)	polyklonaler, biotinylierter Antikörper gegen das Chemokin MCP-1 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
Anti-MCP-2 (MAB281)	monoklonales Antiserum gegen das Chemokin MCP-2 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
Anti-MCP-2 (BAF281)	polyklonaler, biotinylierter Antikörper gegen das Chemokin MCP-2 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
Anti-MCP-4 (MAB327)	monoklonales Antiserum gegen das Chemokin MCP-4 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
Anti-MCP-4 (BAF327)	polyklonaler, biotinylierter Antikörper gegen das Chemokin MCP-4 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
Anti-I-309 (MAB272)	monoklonales Antiserum gegen das Chemokin I-309 (R&D Systems, Minneapolis, USA)

Anti-I-309 (BAF272)	polyklonaler, biotinylierter Antikörper gegen das Chemokin I-309 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
Anti-TCA-3-ELISA	<i>Colorimetric Sandwich Elisa</i> gegen murines TCA-3 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
Anti-IFN β -ELISA	<i>Colorimetric Sandwich Elisa</i> gegen humanes Interferon β (R&D Systems, Minneapolis, USA)

II.1.8 Vektoren und rekombinante Plasmide

pSVL	eukaryontischer Expressionsvektor, Pen ^R (Pharmacia, Freiburg)
pECE	eukaryontischer Expressionsvektor, Amp ^R
pcDNA3.1	eukaryontischer Expressionsvektor, Amp ^R (Invitrogen, Karlsruhe)
pECE-STAT5b	pECE, in den die cDNA für den Transkriptionsfaktor STAT5b inseriert wurde; freundlicherweise von Dr. C. Gerhartz zur Verfügung gestellt.
pcDNA3.1.M	pcDNA3.1, in den die cDNA des Matrix-Proteins des <i>vesicular stomatitis virus</i> inseriert wurde; freundlicherweise von Dr. L. Terstegen zur Verfügung gestellt.
pSVL-IL-5R α /gp130 YFFFFFF (α /gp130 YFFFFFF)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5R α /gp130 inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5R α ist mit der Transmembran- und der intrazellulären Region des gp130 fusioniert, dessen Tyrosine Y ₇₅₉ , Y ₇₆₇ , Y ₈₁₄ , Y ₉₀₅ und Y ₉₁₅ durch Phenylalanine substituiert sind; freundlicherweise von Dr. M. Weißenbach zur Verfügung gestellt (132).
pSVL-IL-5R β /OSMR Stop1 (β /OSMR Stop1)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5R β /OSMR inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5R β ist mit der Transmembran- und der intrazellulären Region des OSMR fusioniert, dessen C-terminal vom Leucin L ₉₅₂ gelegene Aminosäuren deletiert sind; freundlicherweise von Dr. S. Radtke zur Verfügung gestellt (133).
pSVL-IL-5R β /OSMR Y _{837/839} F Stop1 (β /OSMR Y _{837/839} F Stop1)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5R β /OSMR inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5R β ist mit der Transmembran- und der intrazellulären Region des humanen OSMR fusioniert, dessen Tyrosine Y ₈₃₇ und Y ₈₃₉ durch Phenylalanine substituiert und dessen C-terminal vom Leucin L ₉₅₂ gelegene Aminosäuren deletiert sind; freundlicherweise von Dr. C. Stroß zur Verfügung gestellt.
pSVL-IL-5R β /OSMR Y ₈₆₁ F Stop1 (β /OSMR Y ₈₆₁ F Stop1)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5R β /OSMR inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5R β ist mit der Transmembran- und der intrazellulären Region des OSMR fusioniert, dessen Tyrosin Y ₈₆₁ durch Phenylalanin substituiert und dessen C-terminal vom Leucin L ₉₅₂

	gelegene Aminosäuren deletiert sind; freundlicherweise von PD Dr. H. Hermanns zur Verfügung gestellt.
pSVL-IL-5Rβ/OSMR Y _{917/945} F Stop1 (β/OSMR Y _{917/945} F Stop1)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5Rβ/OSMR inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5Rβ ist mit der Transmembran- und der intrazellulären Region des humanen OSMR fusioniert, dessen Tyrosine Y ₉₁₇ und Y ₉₄₅ durch Phenylalanine substituiert und dessen C-terminal vom Leucin L ₉₅₂ gelegene Aminosäuren deletiert sind; freundlicherweise von Dr. C. Stroß zur Verfügung gestellt.
pSVL-IL-5Rβ/OSMR YFFFFFF Stop1 (β/OSMR YFFFFFF Stop1)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5Rβ/OSMR inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5Rβ ist mit der Transmembran- und der intrazellulären Region des humanen OSMR fusioniert, dessen Tyrosine Y ₈₃₇ , Y ₈₃₉ , Y ₈₆₁ , Y ₉₀₁ , Y ₉₁₇ , und Y ₉₄₅ durch Phenylalanine substituiert und dessen C-terminal vom Leucin L ₉₅₂ gelegene Aminosäuren deletiert sind; freundlicherweise von Dr. C. Stroß zur Verfügung gestellt.
pSVL-IL-5Rβ/muOSMR Stop1 (β/muOSMR Stop1)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5Rβ/OSMR inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5Rβ ist mit der Transmembran- und der intrazellulären Region des murinen OSMR fusioniert, dessen C-terminal vom Leucin L ₉₄₈ gelegene Aminosäuren deletiert sind; freundlicherweise von Dr. S. Radtke zur Verfügung gestellt (61).
pSVL-IL-5Rβ/OSMR Box1/2 (β/OSMR Box1/2)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5Rβ/OSMR inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5Rβ ist mit der Transmembran- und der intrazellulären Region des OSMR fusioniert, dessen C-terminal vom Serin S ₈₂₆ gelegene Aminosäuren deletiert sind; freundlicherweise von Dr. S. Radtke zur Verfügung gestellt.
pSVL-IL-5Rβ/muOSMR Box1/2 (β/muOSMR Box1/2)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5Rβ/OSMR inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5Rβ ist mit der Transmembran- und der intrazellulären Region des murinen OSMR fusioniert, dessen C-terminal vom Serin S ₈₁₈ gelegene Aminosäuren deletiert sind; freundlicherweise von Dr. S. Radtke zur Verfügung gestellt.
pSVL-IL-5Rβ/OSMR F ₈₂₀ C Box1/2 (β/OSMR F ₈₂₀ C Box1/2)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5Rβ/OSMR inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5Rβ ist mit der Transmembran- und der intrazellulären Region des humanen OSMR fusioniert, dessen C-terminal vom Serin S ₈₂₆ gelegene Aminosäuren deletiert sind. Die Aminosäure Phenylalanin F ₈₂₀ ist durch die komplementäre Aminosäure Cystein C ₈₁₅ des murinen OSMR ersetzt; freundlicherweise von B. Lippok zur Verfügung gestellt.
pSVL-IL-5Rβ/OSMR P ₈₁₃ A Box1/2 (β/OSMR P ₈₁₃ A Box1/2)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5Rβ/OSMR inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5Rβ ist mit der Transmembran- und der intrazellulären Region des humanen OSMR fusioniert, dessen C-terminal vom Serin S ₈₂₆ gelegene Aminosäuren deletiert sind. Die Aminosäure

	Prolin P ₈₁₃ ist durch die komplementäre Aminosäure Alanin A ₈₀₈ des murinen OSMR ersetzt; freundlicherweise von B. Lippok zur Verfügung gestellt.
pSVL-IL-5Rβ/OSMR Box1/2 mu Box2 (β/OSMR Box1/2 mu Box2)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5Rβ/OSMR inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5Rβ ist mit der Transmembran- und der intrazellulären Region des humanen OSMR fusioniert, dessen C-terminal vom Serin S ₈₂₆ gelegene Aminosäuren deletiert sind. Die Aminosäuren A ₈₀₆ bis T ₈₂₃ sind durch die komplementären Aminosäuren V ₈₀₀ bis S ₈₁₇ des murinen OSMR ersetzt; freundlicherweise von Dr. S. Radtke zur Verfügung gestellt.
pSVL-IL-5Rβ/OSMR Box1/2 mu Interbox (β/OSMR Box1/2 mu Interbox)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5Rβ/OSMR inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5Rβ ist mit der Transmembran- und der intrazellulären Region des humanen OSMR fusioniert, dessen C-terminal vom Serin S ₈₂₆ gelegene Aminosäuren deletiert sind. Die Aminosäuren I ₇₈₂ bis S ₈₀₀ sind durch die komplementären Aminosäuren I ₇₇₈ bis K ₇₉₄ des murinen OSMR ersetzt; freundlicherweise von Dr. S. Radtke zur Verfügung gestellt.
pSVL-IL-5Rβ/muOSMR Box1/2 hu Box2 (β/muOSMR Box1/2 hu Box2)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5Rβ/OSMR inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5Rβ ist mit der Transmembran- und der intrazellulären Region des murinen OSMR fusioniert, dessen C-terminal vom Serin S ₈₁₈ gelegene Aminosäuren deletiert sind. Die Aminosäuren V ₈₀₀ bis S ₈₁₇ sind durch die komplementären Aminosäuren A ₈₀₆ bis T ₈₂₃ des humanen OSMR ersetzt; freundlicherweise von Dr. S. Radtke zur Verfügung gestellt.
pSVL-IL-5Rβ/muOSMR Box1/2 hu Interbox (β/mu OSMR Box1/2 hu Interbox)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5Rβ/OSMR inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5Rβ ist mit der Transmembran- und der intrazellulären Region des murinen OSMR fusioniert, dessen C-terminal vom Serin S ₈₁₈ gelegene Aminosäuren deletiert sind. Die Aminosäuren I ₇₇₈ bis K ₇₉₄ sind durch die komplementären Aminosäuren I ₇₈₂ bis S ₈₀₀ des humanen OSMR ersetzt; freundlicherweise von Dr. S. Radtke zur Verfügung gestellt.

II.1.9 Eukaryontische Zellen

HEK293T	adhärent wachsende, SV40-transformierte, humane epitheliale Nierenzelllinie; Kultivierung in DMEM-Medium ergänzt mit FKS und Penicillin/Streptomycin; freundlicherweise von Dr. S. Pflanz (Palo Alto, USA) zur Verfügung gestellt.
HEL	humane lymphoblastoide Suspensionszelllinie; Kultivierung in RPMI-Medium ergänzt mit FKS; freundlicherweise von Dr. C. Haan (Luxemburg) zur Verfügung gestellt.

U2OS	adhärent wachsende, humane Osteosarkomzelllinie; Kultivierung in DMEM-Medium ergänzt mit FKS.
C20/A4	adhärent wachsende, humane Chondrozyten-zelllinie; Kultivierung in DMEM-Medium ergänzt mit FKS; freundlicherweise von Prof. Dr. M. Goldring (Boston, USA) zur Verfügung gestellt.
HDF	adhärent wachsende, humane primäre dermale Fibroblasten; Kultivierung in DMEM-Medium ergänzt mit FKS und Penicillin/Streptomycin; freundlicherweise von der Dermatologie (Aachen) zur Verfügung gestellt.
HSF	adhärent wachsende, humane primäre Synovialfibroblasten; Kultivierung in OptiMEM-Medium ergänzt mit FKS; freundlicherweise von E. Van de Leur (Aachen) zur Verfügung gestellt.
RASF	adhärent wachsende, humane primäre Synovialfibroblasten von an Rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten; Kultivierung in DMEM-Medium ergänzt mit FKS und Penicillin/Streptomycin; freundlicherweise von Prof. Dr. T. Pap (Münster) zur Verfügung gestellt.
OASF	adhärent wachsende, humane primäre Synovialfibroblasten von an Athrose erkrankten Patienten; Kultivierung in DMEM-Medium ergänzt mit FKS und Penicillin/Streptomycin; freundlicherweise von Prof. Dr. M. Pap (Münster) zur Verfügung gestellt.
HLF	adhärent wachsende, humane primäre Lungenfibroblasten; Kultivierung in OptiMEM-Medium ergänzt mit FKS und Penicillin/Streptomycin; freundlicherweise von Prof. Dr. P. Marynen (Leuven, Belgien) zur Verfügung gestellt.
HCF	adhärent wachsende, humane primäre Cervixfibroblasten; Kultivierung in DMEM-Medium ergänzt mit FKS und Penicillin/Streptomycin; freundlicherweise von E. Van de Leur (Aachen) zur Verfügung gestellt.
2C4, 2fTGH, U4C, U1A, γ 2A	adhärent wachsende, humane Fibrosarkom-Zelllinien; Kultivierung in DMEM-Medium ergänzt mit FKS, Penicillin/Streptomycin und G418; freundlicherweise von Dr. I. M. Kerr (London, UK) zur Verfügung gestellt.
MEF ^{fl/fl(STAT3)}	adhärent wachsende, embryonale murine Fibroblasten-Zelllinie von homozygoten Mäusen, in denen das STAT3-Gen zwischen lox-Sequenzen liegt; Kultivierung in DMEM-Medium ergänzt mit FKS und Penicillin/Streptomycin; freundlicherweise von Prof. Dr. V. Poli (Turin, Italien) zur Verfügung gestellt.
MEF ^{STAT3-/-}	STAT3-defiziente MEFs; durch Infektion der MEF ^{fl/fl(STAT3)} -Zellen mit einem Cre-Rekombinase-exprimierenden Adenovirus hergestellt; Kultivierung in DMEM-Medium ergänzt mit FKS und Penicillin/Streptomycin;

	freundlicherweise von Prof. Dr. V. Poli (Turin, Italien) zur Verfügung gestellt.
MEF ^{-fl/fl(STAT5)}	adhärent wachsende, embryonale murine Fibroblasten-Zelllinie von homozygoten Mäusen, in denen das STAT5-Gen zwischen lox-Sequenzen liegt; Kultivierung in DMEM-Medium ergänzt mit FKS und Penicillin/Streptomycin; freundlicherweise von Prof. Dr. L. Hennighausen (Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt.
MEF ^{STAT5-/-}	STAT5-defiziente MEFs; durch Infektion der MEF ^{-fl/fl(STAT5)} -Zellen mit einem Cre-Rekombinase-exprimierenden Adenovirus hergestellt; Kultivierung in DMEM-Medium ergänzt mit FKS und Penicillin/Streptomycin; freundlicherweise von Prof. Dr. L. Henninghausen (Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt.
Hek293FlpInTRex IL-5R α /gp130, IL-5R β /OSMR Stop1	Hek293FlpInTRex-Zelllinie, die stabil den IL-5R α /gp130 und nach Induktion mit Doxycyclin zusätzlich den IL-5R β /OSMRStop1 exprimiert; Kultivierung in DMEM-Medium ergänzt mit FKS und Penicillin/Streptomycin; freundlicherweise von Dr. S. Radtke und B. Lippok zur Verfügung gestellt.
Hek293FlpInTRex IL-5R α /gp130, IL-5R β /OSMR Y _{917/945} F Stop1	Hek293FlpInTRex-Zelllinie, die stabil den IL-5R α /gp130 und nach Induktion mit Doxycyclin zusätzlich den IL-5R β /OSMRY _{917/945} FStop1 exprimiert; Kultivierung in DMEM-Medium ergänzt mit FKS und Penicillin/Streptomycin; freundlicherweise von Dr. C. Stroß zur Verfügung gestellt.
Hek293FlpInTRex IL-5R α /gp130, IL-5R β /OSMR YFFFFFF Stop1	Hek293FlpInTRex-Zelllinie, die stabil den IL-5R α /gp130 und nach Induktion mit Doxycyclin zusätzlich den IL-5R β /OSMRYFFFFFFStop1 exprimiert; Kultivierung in DMEM-Medium ergänzt mit FKS und Penicillin/Streptomycin; freundlicherweise von Dr. C. Stroß zur Verfügung gestellt.
Monozyten	humane primäre Monozyten, isoliert aus frischen <i>buffy coats</i> (II.2.2).
T-Lymphozyten	humane primäre T-Lymphozyten, isoliert aus frischen <i>buffy coats</i> (II.2.3).
Neutrophile Granulozyten	humane primäre neutrophile Granulozyten, isoliert aus frischen <i>buffy coats</i> (II.2.4).

II.1.10 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur

DMEM-Flüssigmedium	(Gibco, Eggenstein)
OptiMEM-Flüssigmedium	(Gibco, Eggenstein)
RPMI-Flüssigmedium	(Gibco, Eggenstein)
RPMI-Flüssigmedium	(Sigma, Taufkirchen)
Spinner-Medium	(Sigma, Taufkirchen)
FKS (fötale Kälberserum)	(Seromed, Wien, Österreich)
Penicillin; Streptomycin	(BioWhittaker, Verviers, Belgien)
Trypsin(0,05 %)/EDTA(0,02 %)-Lösung	(BioWhittaker, Verviers, Belgien)
Akkutase-Lösung	(Biochrom, Berlin)

Geneticin (G418)	(Sigma, Taufkirchen)
Blasticidin	(Invitrogen, Karlsruhe)
Hygromycin	(Roche, Mannheim)
Doxycyclin	(Sigma, Taufkirchen)
Ficoll	(Amersham, Freiburg)
Humanserum	(PAA, Cölbe)
Glutamin	(Sigma, Taufkirchen)
Fibronectin	(Becton Dickinson, Heidelberg)

PBS:	200	mM	NaCl
	2,5	mM	KCl
	8,0	mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5	mM	KH ₂ PO ₄
		pH	7,4

10 x PBS:	2	M	NaCl
	25	mM	KCl
	80	mM	Na ₂ HPO ₄
	15	mM	KH ₂ PO ₄
		pH	7,4

II.1.11 Bakterienstamm

Zur Klonierung wurde der *E.coli*-Stamm JM83 verwendet.

II.2 Zellbiologische Methoden

II.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Zellen wurden in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Die jeweiligen Medien enthielten zusätzlich 10% fötales Kälberserum sowie wahlweise 60mg/ml Penicillin und 100mg/ml Streptomycin. Dem Medium der stabil transfizierten Hek293FlpInTRex-Zellen wurde zur Selektion G418 (0,5mg/ml) und zusätzlich Blasticidin (15µg/ml) und Hygromycin (100µg/ml) zugegeben. Außerdem wurde dem Medium der 2C4, U4C und γ2A Zellen 400µg/ml G418 und dem Medium der U1A Zellen 100µg/ml Hygromycin beigemischt. Zur Weiterkultivierung mussten die adhärent wachsenden Zellen einer konfluent bewachsenen Platte mit PBS gewaschen und durch eine Behandlung mit Trypsin/EDTA bzw. Akkutase losgelöst werden. Die diversen

Zelllinien und die primären Fibroblasten wurden je nach vorliegender Konfluenz entsprechend verdünnt in frischem Medium aufgenommen.

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die von der Platte gelösten Zellen mit kaltem 20%igen FKS- und 10% DMSO-haltigem Medium versetzt, in Kryoröhrchen aliquotiert und zur langsamen Abkühlung der Zellen zunächst für 24 h bei -80°C gelagert, bevor die Zellen zur längeren Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt wurden. Zum Auftauen wurden die Zellen bei 37°C inkubiert und das DMSO-haltige Medium mit 10ml kaltem Medium verdünnt, um dann die Zellen bei 1000 upm und 4°C abzuzentrifugieren, in neuem, warmem Medium aufzunehmen und in einer Zellkulturschale auszusäen.

II.2.2 Isolation und Kultivierung primärer humaner Blutmonozyten aus *buffy coats*

Die Isolation primärer, humaner Monozyten erfolgte in zwei Schritten aus frischen *buffy coats* bei Raumtemperatur. Um eine vorzeitige und unkontrollierte Aktivierung der Monozyten durch LPS zu verhindern, mussten alle im Folgenden genutzten Lösungen und Materialien garantiert LPS frei sein. Zunächst wurden in einem 50ml Gefäß 20ml Ficoll vorgelegt, um dann mit 30ml Blut, das zuvor 1:2 mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt wurde, vorsichtig überschichtet und bei 1200 upm 25 min ohne Bremse zentrifugiert zu werden. Da Ficoll eine höhere Dichte als Thrombozyten, Lymphozyten oder Monozyten und eine geringere als Erythrozyten und Granulozyten hat, konnten mit Hilfe dieses Gradienten die Erythrozyten und Granulozyten, die sich während der Zentrifugation auf dem Boden des Falcons absetzten, entfernt werden. Alle peripheren mononukleären Zellen (PBMC) befanden sich dagegen in der Interphase des Gradienten und wurden vorsichtig in ein neues Gefäß überführt und dreimal mit Spinner-Medium gewaschen. Die zwischenzeitlichen Zentrifugationsschritte erfolgten für 10 min bei 1000 upm. Mit Hilfe des *Dynal® Monocyte Negative Isolation kit* wurden dann im zweiten Arbeitsschritt Monozyten aus den zuvor gewonnenen PBMCs nach Herstellerangaben isoliert. Die Zellen wurden dann in mit 2,5% hitzeinaktiviertem Humanserum und 1% Glutamin angereichertem RPMI-Medium ausgesät. Die Reinheit der Monozyten wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt, indem die

Oberflächenexpression von CD14, einem typischen Oberflächenmarker von Monozyten und Makrophagen, untersucht wurde.

II.2.3 Isolation und Kultivierung primärer humaner T-Lymphozyten aus *buffy coats*

Neben der Monozytenaufreinigung erfolgte auch die Isolation primärer, humaner T-Lymphozyten aus frischen *buffy coats*. In selber Art und Weise wurde hier im ersten Schritt das Blut verdünnt, auf den Ficoll-Gradienten geschichtet und zentrifugiert. Die erhaltenen PBMCs wurden dann mit Hilfe des *Dyna® T Cell Negative Isolation kit* aufgearbeitet. Die isolierten T-Lymphozyten wurden dann in mit 2,5% hitzeinaktiviertem Humanserum und 1% Glutamin angereichertem RPMI-Medium ausgesät. Die Reinheit der T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt, indem die Oberflächenexpression von CD3, einem typischen Oberflächenmarker von T-Lymphozyten untersucht wurde.

II.2.4 Isolation und Kultivierung primärer humaner neutrophiler Granulozyten aus *buffy coats*

Wie bei den Monozyten und T-Lymphozyten erfolgte auch die Isolation primärer, humaner, neutrophiler Granulozyten aus frischen *buffy coats*. In selber Art und Weise wurde hier im ersten Schritt das Blut verdünnt, auf den Ficoll-Gradienten geschichtet und zentrifugiert. Durch die geringere Dichte von Granulozyten gegenüber Ficoll bedingt, waren die neutrophilen Granulozyten neben den Erythrozyten im dunkelroten Pellet des ersten Zentrifugationsschritts zu finden. Das überständige Plasma und die Schichten des Ficoll-Gradienten konnten zur weiteren Gewinnung von Monozyten bzw. T-Lymphozyten genutzt oder verworfen werden. Um Erythrozyten und Granulozyten voneinander zu trennen, wurden im zweiten Schritt die Erythrozyten in 35ml destilliertem Wasser durch 30sekündiges auf- und abpipettieren lysiert. Die hypotone Lyse wurde durch Zugabe von 4ml 10 x PBS gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1200 upm für 5 min zentrifugiert. Die hypotone Lyse der Erythrozyten wurde dreimal wiederholt, sodass nach dem letzten Zentrifugationsschritt ein weißes Pellet erkennbar war. Abschließend wurden die neutrophilen Granulozyten in RPMI-Medium mit 1% FKS

resuspendiert, gezählt und in Zellkulturschalen ausgesät. Die maximale Kultivierungsdauer in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ betrug 24 h.

II.2.5 Transfektion eukaryontischer Zellen

II.2.5.1 Transiente Transfektion mit FuGene

HEK293T-Zellen wurden mit der FuGene-Methode (Roche) transfiziert. Zunächst wurden die HEK293T-Zellen in DMEM-Medium mit FKS jedoch ohne Antibiotika überführt. Auf die circa 60% konfluenten 10cm-Platten wurde dann jeweils ein 15 min zuvor angesetztes Transfektionsgemisch aus 7,5µg DNA, 15µl FuGene und 100µl DMEM-Medium ohne FKS sowie ohne Antibiotika gegeben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 10 h bei 37°C konnten die Zellen wieder in 10% FKS- und 1% penicillium- und streptomycinhaltiges DMEM-Medium überführt werden. Am nächsten Morgen wurden die Zellen 1:3 gesplittet und weiterkultiviert.

II.2.5.2 Transiente Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

24 h vor der Transfektion wurden 10⁵ Lungenfibroblasten oder MEFs je Vertiefung in einer 6-well –Platte in DMEM mit 10% FKS ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ in einer wassergesättigten Atmosphäre inkubiert.

8µg DNA je Ansatz wurden vor der Transfektion in 96µl isotonischer Glucoselösung aufgenommen und 10 min bei RT inkubiert, um dann mit 304µl PEI-Lösung (2mg/ml) unter kräftigem Schütteln gemischt zu werden. Es folgte eine erneute Inkubation von 10 min bei RT. Zwischenzeitlich konnte bei den zu transfizierenden Fibroblasten das alte Medium durch frisches, vorgewärmtes und FKS-freies Medium ersetzt werden, um dann die 400µl Transfektionsgemisch je well hinzuzupipettieren. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden wurde das Transfektionsmedium entfernt, durch frisches Medium ersetzt und der Versuch für weitere 24 h inkubiert.

II.2.5.3 Transfektion von siRNA

Zur transienten Transfektion von siRNA wurden je 10^5 Zellen in einer Vertiefung einer 6-*well*-Kulturschale ausgesät und über Nacht in DMEM mit 10% FKS bei 37°C und 5% CO₂ in einer wassergesättigten Atmosphäre inkubiert.

Pro Transfektionsansatz wurden 150pmol siRNA in 100µl serumfreiem OptiMEM gelöst und 5 min bei RT inkubiert. Ebenso wurde mit einer Mischung aus 2µl DharmaFECT (Dharmacon, Chicago, USA) und 98µl OptiMEM verfahren. Beide Ansätze wurden dann gemischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert, um dann auf die Zellen gegeben zu werden. Pro *well* wurden weitere 800µl erwärmtes OptiMEM hinzugegeben und die Zellen bei oben genannten Bedingungen inkubiert. Nach 5 h wurden 500µl OptiMEM mit 30% FKS hinzugegeben. Am nächsten Tag erfolgte ein Medienwechsel. Weitere 48 h später standen die transfizierten Zellen zur weiteren Analyse bereit.

II.2.6 Migrationsassay

Die durch einen chemotaktischen Stimulus bedingte Migration von Monozyten/T-Lymphozyten wurde in einem modifizierten Boyden-Kammer-System analysiert. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Monozyten bzw. T-Lymphozyten in einem *transwell*, das in einer Multi-*well*-Platte hängt, ausgesät werden und auf einen Stimulus hin durch die poröse Membran des Einsatzes wandern. Nach ca. 4 h befinden sich die Zellen auf dem Boden des *wells* und können ausgezählt werden.

Die verwendeten Einsätze waren *transwells* aus einer Polycarbonatmembran mit 8µm großen Poren für 24-Lochplatten von Corning Costar (Bodenheim), die vor dem Experiment mit humanem Fibronectin (10µg/cm²) beschichtet wurden. Anschließend wurden 10^5 in je 100µl Medium aufgenommene Monozyten/T-Lymphozyten in den einzelnen Einsätzen ausgesät, die ihrerseits in mit 800µl FKS-freiem Medium gefüllten *wells* hingen. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C und 5% CO₂ bildeten die Monozyten eine dichte Zellschicht direkt oberhalb der Poren. Im nächsten Schritt wurden die mit Monozyten/T-Lymphozyten gefüllten *transwells* in benachbarte *wells* der 24-Lochplatte überführt, die mit

diversen FKS-freien Zellüberständen gefüllt waren. Nach 4 h konnten die migrierten Zellen am Boden der einzelnen wells der 24-Lochplatte ausgezählt werden.

II.3 Molekularbiologische Methoden

II.3.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterienkulturen

Alle Klonierungsschritte wurden in *E.coli* JM83 durchgeführt. Die rekombinanten *E.coli* - Bakterien wurden in LB-Medium unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums (Ampicillin: 100µg/ml) bei 37°C in einem Schüttelkolben mit 200 upm kultiviert. Stammkulturen zur längerfristigen Lagerung wurden mit 20% Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

LB-Flüssigmedium:	5	g/l	NaCl
	5	g/l	Yeast extract (Difco, Detroit, USA)
	10	g/l	Bactotrypton (Difco, Detroit, USA)
	10	mM	Tris HCl, pH 8
	1	mM	MgSO ₄

LB-Nährboden wurde durch Zugabe von 1,5% Bacto-Agar hergestellt.

II.3.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Aus einer 50ml Übernachtkultur wurden 500ml LB-Medium mit Bakterien zu einer OD₆₀₀ von 0,02 angeimpft und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach Erhalt einer OD₆₀₀ von 0,3 musste die Bakterienkultur in einem Eisbad schnell abgekühlt, die Bakterien bei 4°C abzentrifugiert und das Sediment in 125ml einer eiskalten 50mM CaCl₂-Lösung resuspendiert werden. Nach neuerlichem Zentrifugieren wurde das Sediment in 25ml einer Lösung mit 50mM CaCl₂ und 10% Glycerin aufgenommen, um schließlich in Aliquots von je 500µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren zu werden. Auf diese Art vorbehandelte Zellen konnten bei -80°C gelagert und mehrere Monate zur Transformation verwendet werden.

II.3.3 Transformation kompetenter Bakterien

10ng einer Plasmid-DNA oder 10–20µl eines Ligationsansatzes wurden mit 100µl einer Suspension kompetenter Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine 90 sec andauernde Inkubation bei 42°C. Nach zweiminütiger Abkühlung auf Eis, der Aufnahme der Zellen in 800µl LB-Medium und weiteren 30 min bei 37°C wurden die Bakterien abzentrifugiert. Danach wurde das Medium bis auf 100µl abgenommen und die Bakterien auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika ausplattiert. Nach abschließender Inkubation über Nacht bei 37°C konnten die gewachsenen Kolonien gezählt und rekombinante Klone analysiert werden.

II.3.4 Qiagen-Plasmid-Mini-*kit*

Zur schnellen Charakterisierung rekombinanter Bakterienklone wurde die Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab verwendet. Nach Vermehrung von Bakterien in einer 2ml LB-Kultur wurden diese durch Zentrifugation sedimentiert. Der Aufschluss der Bakterien und die Isolation der Plasmid-DNA erfolgten nach den Herstellerangaben der Firma Qiagen (Hilden).

II.3.5 Qiagen-Plasmid-Maxi-*kit*

Mit Hilfe von Maxi-Plasmidpräparations*kits* wurden Bakterien aus einer 500ml Übernachtkultur nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) aufgearbeitet. So erhaltene größere Mengen hoch reiner Plasmid-DNA wurden in Wasser resuspendiert.

II.3.6 Extraktion von RNA

Die Extraktion von RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini RNA-Isolationskits* der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben. Um die Viskosität der Zelllysate zu verringern, wurde zusätzlich das *Qiashredder kit* von Qiagen verwendet.

II.3.7 Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren

Die quantitative Bestimmung von DNA und RNA erfolgte photometrisch am Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) über die OD_{260} . Eine Extinktion $E_{260} = 1,0$ entspricht $50\mu\text{g}$ doppelsträngiger DNA bzw. $40\mu\text{g}$ RNA. Die Reinheit der Nukleinsäurepräparation wurde mit Hilfe der OD_{280} ermittelt. Der Quotient E_{260}/E_{280} sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

II.3.8 Restriktion von DNA

Die Restriktion der DNA erfolgte nach Standardvorschriften. Bei präparativen Ansätzen betragen die Inkubationszeiten zwischen einer und drei Stunden. Sollte die DNA einem doppelten Restriktionsverdau unterzogen werden, so wurden die beiden Endonukleasen, soweit es die entsprechenden Pufferbedingungen zuließen, gleichzeitig eingesetzt. Bei unverträglichen Puffersystemen wurde nach der ersten Restriktion eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, um anschließend die DNA mit 1Vol Isopropanol und 0,025Vol 8M LiCl für 30 min bei -20°C zu fällen. Im Anschluss an eine Zentrifugation (10 min, 14000 upm) wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser gelöst, um dann mit dem zweiten Enzym geschnitten zu werden.

II.3.9 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Nach der enzymatischen Spaltung wurden die Größen der DNA-Fragmente über ihre gelelektrophoretischen Mobilitäten ermittelt. Die Restriktionsansätze wurden mit der entsprechenden Menge 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein Agarosegel (1% SeaKem-LE-Agarose, Biozym, Hameln) geladen. Um die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde der Agarose das in die Doppelhelix interkalierende Ethidiumbromid ($0,1\mu\text{g}/\text{ml}$) zugesetzt. Für die Elektrophorese in Horizontalgelapparaturen wurde 1 x TAE-Puffer als Laufpuffer verwendet, dem ebenfalls $0,1\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid zugegeben wurde.

6 x DNA-Probenpuffer:	15	%	Ficoll400
	0,25	%	Bromphenolblau
	0,25	%	Xylencyanol
1 x TAE-Puffer:	40	mM	Tris-Base
	50	mM	EDTA
	32	mM	Essigsäure

II.3.10 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um aus einem Agarosegel ausgeschnittene DNA-Fragmente aus der Gelmatrix zu eluieren, wurde das Qiaquick Gelextraktionskit der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

II.3.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation doppelsträngiger DNA wurde mit der T4-DNA-Ligase in ATP-enthaltendem Ligationspuffer durchgeführt. Pro Ansatz wurden 50–100ng geschnittener Vektor und ein 3–5facher molarer Überschuss an zu inserierender DNA eingesetzt. Die Menge von Vektor- und *insert*-DNA wurde aus dem Gel abgeschätzt, um daraus das molare Verhältnis der beiden DNA-Fragmente zu bestimmen. Die Ligationsansätze wurden 2-3 h bei 37°C oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, um daraufhin zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet zu werden.

10 x Ligasepuffer:	0,5	M	Tris HCl pH 8,0
	0,2	M	Tris HCl pH 7,4
	0,1	M	DTT
	0,1	M	MgCl ₂
	10	mM	ATP
	50	µg/ml	BSA

II.3.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Punktmutationen oder Restriktionsschnittstellen wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion und des *QuickChange site directed mutagenesis kits* bzw. des *QuickChange XL site directed mutagenesis kits* (Stratagene, La Jolla, USA) in die cDNAs eingefügt. Die *primer* hierfür wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen.

Pipettierschema:

- 40ng DNA-Matrize
- 125ng *primer* 1 (1pmol/ μ l)
- 125ng *primer* 2 (1pmol/ μ l)
- 5 μ l dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 2,5mM)
- 3 μ l *Quick Solution*
- 5 μ l 10 x Puffer
- ad 50 μ l Wasser
- 1 μ l Pfu Turbo DNA-Polymerase (2,5U/ μ l)

PCR-Bedingungen: 12 Zyklen:

- Denaturierung: 95°C, 30 sec
- Hybridisierung: 55°C, 60 sec
- Extension: 68°C, 390 sec

II.3.13 Reverse Transkriptase-PCR

Mit Hilfe des *One-step RT-PCR kits* der Firma Qiagen (Hilden) wurde extrahierte RNA im ersten Schritt nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Durch Einsatz synthetischer Oligonukleotide als *primer* konnten gewünschte Bereiche der cDNAs im zweiten Schritt amplifiziert werden.

Ein RT-PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

4	μ l	5x Puffer
0,8	μ l	dNTPs
0,8	μ l	Enzym-Mix
1	μ l	Sequenz- <i>primer</i>
1	μ l	reverser <i>primer</i>
1	μ l	RNA (=1 μ g)
11,4	μ l	H ₂ O

Im Thermocycler wurden folgende Reaktionen durchgeführt:

30 min	50°C	Umschreiben der mRNA in cDNA
15 min	95°C	Denaturierung
40 sec	94°C	Denaturierung
30 sec	56°C	<i>primer</i> -Bindung
30 sec	72°C	<i>extension</i>
10 min	72°C	letzte <i>extension</i>

II.3.14 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mit Hilfe des PRISM™ *Ready Reaction DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing kits* (Perkin Elmer, Boston, USA). Das Prinzip der automatischen Sequenzierung nach Sanger beruht auf dem Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide in ein DNA-Molekül während einer PCR, was zum statistischen Kettenabbruch führt (134). Der PCR-Ansatz wurde wie folgt zusammenpipettiert:

- 4µl dRhodamin-Terminator-Mix
- 1µg dsDNA-Matrize
- 10pmol Oligonukleotid-*primer*
- ad 20µl Wasser

In einem Thermocycler wurde die DNA-Matrize unter Einbau der fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide mit folgendem Programm in 25 Reaktionszyklen amplifiziert:

- 20 sec, 96°C Denaturierung
- 20 sec, 50°C Hybridisierung
- 240 sec, 60°C DNA-Verlängerung

Anschließend wurde die DNA aus dem PCR-Ansatz mit 10µl 3M Na-Acetat (pH 4,6) und 250 µl 100%igem Ethanol unter 20minütiger Zentrifugation bei 14000 upm und 4°C gefällt. Der Niederschlag wurde mit 70% igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 3,4µl deionisiertem Formamid und 0,6µl EDTA (50mM, pH 8,0) resuspendiert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des ABI Modell 310A Sequenzierers (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers.

II.3.15 RNase Protection Assay (RPA)

Bei einem RPA wird einzelsträngige mRNA mit radioaktiv markierten einzelsträngigen komplementären RNA-Strängen hybridisiert. Im Folgenden findet

ein Verdau der nicht gebundenen oder überhängenden einzelsträngigen mRNA statt. Die geschützten Doppelstränge werden dann in einem Harnstoffgel nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Detektion erfolgt über die radioaktive Markierung.

II.3.15.1 Radioaktive Markierung der Sonden

Um die Sonden radioaktiv zu markieren, wurde bei RT folgender Mix in Mikro-Schraubröhren (Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert:

1µl	RNase Inhibitor (Promega, Madison, USA)
3µl	GAC-Mix im Verhältnis 1:1:1 (Promega, Madison, USA)
2µl	DTT 100 mM (Promega, Madison, USA)
4µl	Transkriptionspuffer (Promega, Madison, USA)
1µl	<i>RPA-Template-Set</i> (Becton Dickinson, Heidelberg)
10µl	[$\alpha^{32}\text{P}$]-dUTP
1µl	T7-Polymerase (Promega, Madison, USA)

Der Ansatz wurde kurz abzentrifugiert und dann bei 37°C für 1 h inkubiert. Nach Zugabe von 1µl RNase freier DNase (Roche, Mannheim) erfolgte eine zweite Inkubation bei gleicher Temperatur für 15 min. Nach der Zugabe von 77µl STE-Puffer und 100µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 1:1:1) wurde die Mischung in ein 1,5ml *Phase-Lock-Gel-Heavy-Tube* (Eppendorf, Hamburg) überführt. Um die wässrige von der organischen Phase zu trennen, erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 14000 upm für 5 min bei RT. Die wässrige Phase wurde in eine neue Mikro-Schraubröhre überführt und zur Ausfällung der Sonden mit 25µl 10M NH₄OAc, 3µl t-RNA (Roche, Mannheim) und 600µl eiskaltem absoluten Ethanol versetzt.

Die Fällung erfolgte für zwei Stunden bei -20°C auf Trockeneis. Die aufgetauten Ansätze wurden dann bei 14000 upm für 20 min bei 4°C abzentrifugiert. Um letzte Reste des Ethanol zu entfernen wurden die pelletierten Sonden 15 min bei 37°C getrocknet und dann unter Zugabe von 25µl 10M NH₄OAc und 600µl absolutem Ethanol erneut für 1,5 h bei -20°C auf Trockeneis g efällt. Nach einem erneuten Trocknungsschritt bei 37°C wurden die Sonden in 40µl STE-Puffer aufgenommen und bis zur Verwendung maximal zwei Tage bei -20°C gelagert.

STE-Puffer:	10	mM	Tris HCl pH 7,5
	1	mM	EDTA
	0,1	%	SDS

II.3.15.2 Hybridisierung

Die für den Versuch eingesetzte RNA wurde mit einer *Speed-Vac* auf eine Konzentration von 10µg/6µl eingengt und dann mit 24µl deionisiertem Formamid (Sigma, Taufkirchen) versetzt. Zu jeder Probe wurden 6µl Hybridisierungs-Mix gegeben. Nun wurden die Proben zunächst für 5 min bei 95°C erhitzt und dann über Nacht in einem 60°C warmen Wasserbad inkubiert.

Hybridisierungs-Mix je Probe:	3	µl	Hybridisierungspuffer
	1	µl	radioaktiv markierte Sonde
	2	µl	STE-Puffer

Hybridisierungspuffer:	400	mM	PIPES pH 6,4
	4	M	NaCl
	1	mM	EDTA

II.3.15.3 Verdau der einzelsträngigen RNA

Nach der Hybridisierung wurden am nächsten Morgen je 404µl *cutting*-Mix zu den Proben gegeben und die Ansätze bei 37°C inkubiert. Nach einer halben Stunde wurden für weitere 15 min je 2µl Proteinase K (Qiagen, Hilden) hinzugegeben.

Im nächsten Schritt wurde jeder Ansatz mit 450µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol aufgefüllt, kräftig gemischt und in ein *Phase-Lock-Gel-Heavy-Tube* überführt, um bei 14000 upm für 15 min abzentrifugiert zu werden. 370µl der wässrigen Phase wurden in eine Mikro-Schraubrohre transferiert, in dem bereits 5µl t-RNA (10mg/ml) vorgelegt worden war. Durch Zugabe von 370µl eiskaltem Isopropanol und zweistündiger Inkubation bei -20°C auf Trockeneis wurden die RNA-Hybride gefällt. Nach dem Auftauen wurde die RNA bei 14000 upm für 20 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Um Isopropanolreste zu entfernen erfolgte ein zweiter, fünfminütiger Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen.

Die pelletierte RNA wurde bei 37°C getrocknet, in 3 µl kaltem DEPC-Wasser und 7 µl Formamid-Probenpuffer resuspendiert und dann für 5 min bei 95°C aufgeköcht, um schließlich auf das mindestens eine Stunde vorgelaufene Gel aufgetragen zu werden.

<i>cutting</i> -Mix je Probe:	360	µl	RNase-Puffer
	40	µl	RNase A (10 mg/ml)
	4	µl	RNase T1 (1,3 mg/ml)

RNase-Puffer:	1	M	Tris HCl pH 7,4
	0,5	mM	EDTA
	5	M	NaCl
	10	%	SDS

Formamid-Probenpuffer:	80	%	deionisiertes Formamid
	1	mM	EDTA pH 8,0
	0,1	%	Bromphenolblau
	0,1	%	Xylencyanol

II.3.15.4 Denaturierende Gelelektrophorese

Die Platten der Gelapparatur wurden mit Millipore H₂O und Ethanol gereinigt. Um später die Ablösung des Gels von den Glasplatten zu ermöglichen, wurde die innere Seite einer Platte mit 5 ml Repelcote (Merck, Darmstadt) silikonisiert.

Die Proben wurden in einem 6%igen Harnstoff-Gel mit 0,5% TBE als Laufpuffer aufgetrennt. Die Gel-Laufzeit betrug ca. zwei Stunden bei 32W. Anschließend wurde das Gel mit Filterpapier von der nicht silikonisierten Platte genommen und bei 70°C für 1 h getrocknet. Bei -80°C wurde das getrocknete Gel über Nacht auf einem Röntgenfilm in einer Expositionskassette aufgelegt. Um die Ergebnisse quantifizieren zu können, konnte das Gel alternativ bei RT für mindestens 6 h auf einen *Storage-Phospho-Screen* aufgelegt werden. Dieser wurde dann autoradiographisch in einem Typhoon 9400 (GE Healthcare, München) ausgewertet.

Acrylamidlösung:	19	%	Acrylamid
	1	%	Bisacrylamid

6 %iges Harnstoff-Gel:	210	g	Harnstoff
	75	ml	Acryamidlösung
	433,5	μ l	10 % APS
	32,5	μ l	TEMED
	65	ml	0,5 x TBE
0,5 x TBE-Puffer:	45	mM	Tris/Base
	45	mM	Borsäure
	1	mM	EDTA

II.4 Proteinchemische und immunologische Methoden

II.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Zu lysierende Zellen wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte entweder die Zugabe von 500 μ l BRIJ- oder 300 μ l Triton-Lysispuffer (jeweils mit Proteaseinhibitoren) pro 10cm-Zellkulturschale. Die Zellen wurden dann mit Hilfe eines Gummischabers von der Platte gelöst, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Membranbestandteile wurden durch 10minütige Zentrifugation bei 14000 upm abgetrennt. Lysate, die nicht für ein analytisches Polyacrylamidgel oder für eine Immunpräzipitation abgenommen wurden, konnten bei -20°C gelagert werden.

Da die Zelllysate oftmals zur Analyse von phosphorylierten Proteinen dienen, wurden die Zellen überwiegend mit Triton-, statt mit BRIJ-Lysispuffer lysiert. Letzterer wird im Gegensatz zu Ersterem besonders bei der Durchführung von Koimmunpräzipitationen benutzt.

Triton-Lysispuffer:	20	mM	Tris HCl pH 7,5
	150	mM	NaCl
	10	mM	NaF
	1	mM	EGTA
	2,5	mM	Na ₂ H ₂ P ₂ O ₇
	1	mM	β -Glycerophosphat
	1	mM	EDTA
	1	%	Triton x-100

BRIJ-Lysispuffer:	20	mM	Tris HCl pH 7,5
	150	mM	NaCl
	10	mM	NaF
	1	mM	EDTA
	1	%	BRIJ 97

Proteaseinhibitoren:	1	mM	Na ₃ VO ₄
	1	mM	PMSF
	5	µg/ml	Aprotinin
	5	µg/ml	Leupeptin
	3	µg/ml	Pepstatin

II.4.2 Zellfraktionierung

Um Aussagen über die Lokalisation eines aktivierten Proteins innerhalb einer Zelle treffen zu können, ist eine subzelluläre Fraktionierung erforderlich.

Alle im Folgenden beschriebenen Fraktionierungs- und Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C und mit eisgekühlten Puffern durchgeführt. Zu Beginn wurden dermale Fibroblasten mit 20ng/ml Medium OSM stimuliert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit PBS, um dann die Zellen in 1ml hypotonem Lysispuffer aufzunehmen. Um eine Steigerung der Lyseeffizienz zu erreichen, erfolgte eine 15 minütige Inkubation auf Eis und eine anschließende Homogenisierung im *Dounce Homogenizer*. Durch zwei je 15 min andauernde Zentrifugationsschritte (500 upm) wurde die Kernfraktion von der zytosolischen Fraktion getrennt. Die gewonnenen Zellkerne wurden daraufhin mehreren Waschschriften mit einem detergentenhaltigen, hypotonen Puffer (0,5% Nonidet P-40/Igepal) unterzogen. Die aufgereinigten Kerne konnten dann mit einem hypertonen Puffer lysiert und bei 12500 upm abzentrifugiert werden. Die aus der hypotonen Lyse hervorgegangene zytosolische Fraktion wurde 1 h bei 33000 upm in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Im Überstand gelöste Proteine gelten *per definitionem* als zytosolisch. Das resultierende membranöse Sediment konnte dann mit einem 1% Tritonpuffer weiter extrahiert werden.

Die erhaltenen Extrakte wurden mehrfach aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Reinheit der Fraktionen wurde mit Hilfe des Westernblotverfahrens und folgender Immundetektion analysiert. Als Kontrollen dienten Calnexin, welches als integrales Protein in der ER-Membran vorkommt und die Lamine A/C, als Bestandteil der inneren Kernmembran.

Hypotoner Lysispuffer:	10	mM	Tris HCl pH 7,5
	10	mM	NaCl
	3	mM	MgCl ₂
Triton-Lysispuffer:	20	mM	Tris HCl pH 7,5
	120	mM	NaCl
	10	mM	NaF
	1	%	Triton x-100
Hypotoner Waschpuffer:	10	mM	Tris HCl pH 7,5
	10	mM	NaCl
	3	mM	MgCl ₂
	0,5	%	Nonidet P-40 (IGEPAL)
Hypertoner Lysispuffer:	20	mM	Tris HCl pH 7,5
	280	mM	NaCl
	10	mM	NaF
	2	%	Triton x-100
je Puffer frisch hinzugeben:	1	mM	Na ₃ VO ₄
	0,8	mM	Pefabloc
	0,5	mM	EDTA
	2,5	µg/ml	Leupeptin
	2,5	µg/ml	Aprotinin
	0,75	µg/ml	Pepstatin

II.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehaltes verschiedener Lösungen erfolgte photometrisch mit Hilfe eines *kits* der Firma Biorad (München) nach der Methode von Bradford (135). Zur Probenbestimmung wurde eine Verdünnung von 2µl Testlösung in 800µl Wasser und 200µl Biorad Gebrauchslösung hergestellt. Die Proben wurden gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteinkonzentration konnte mit Hilfe der OD₅₉₅-Messung bestimmt werden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf einer für BSA ermittelten Eichkurve, aus der sich für eine Extinktion von 0,063 eine Proteinmenge von 1µg ergibt.

II.4.4 Immun- und Koimmunpräzipitation von Proteinen aus Zelllysaten

Die Immunpräzipitation dient zur Anreicherung bestimmter Proteine aus Zelllysaten. Bei der Koimmunpräzipitation werden gleichzeitig auch mit diesen Proteinen assoziierte andere Proteine aufgereinigt. Die methodische Durchführung ist für beide Präzipitationen dieselbe. Zelllysate mit einem Gesamtproteingehalt von 1mg wurden mit 0.8-1 μ g des Erstantikörpers gegen die zu präzipitierenden Proteine versetzt und dann bei 4°C über Nacht im Überkopfschüttler rotiert. Am nächsten Tag wurden in einer einstündigen Inkubation bei 4°C die Protein-Antikörper-Komplexe mit Hilfe von 3mg gequollener Protein-A-Sepharose (Amersham, Freiburg)/Ansatz präzipitiert. Die Lysate wurden anschließend bei 14000 upm eine Minute zentrifugiert, um die Sepharose zur Sedimentation zu bringen. Zur Verringerung der unspezifischen Bindung wurde danach noch zweimal mit je 1ml kaltem Waschpuffer gewaschen. Abschließend wurde die Sepharose in 25 μ l 2x Lämmli-Probenpuffer aufgenommen und die gebundenen Proteine durch 5minütiges Erhitzen bei 95°C abgelöst. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer molaren Masse erfolgte dann in der SDS-Gelelektrophorese.

Triton-Waschpuffer:	20	mM	Tris HCl pH 7,5
	150	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
	10	mM	NaF
	0,1	%	Triton x-100

BRIJ-Waschpuffer:	20	mM	Tris HCl pH 7,5
	150	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
	10	mM	NaF
	0,1	%	BRIJ 97

Proteaseinhibitoren: siehe II.4.1

2x Lämmli-Proben-Puffer:	125	mM	Tris HCl pH 6,8
	20	%	Glycerin
	10	%	β -Mercaptoethanol
	4	%	SDS
	0,01	%	Bromphenolblau

II.4.5 Proteinpräzipitation mit biotinylierten Peptiden

Eine Präzipitation von Proteinen kann auch mit Hilfe von biotinylierten Peptiden erfolgen, an die bestimmte Proteine binden. Zu Beginn wurden 6µl 0,5mM Peptid mit 10µl NeutrAvidin-Sepharose (Pierce, Bonn) und 300µl PBS für eine Stunde bei 4°C über Kopf geschüttelt. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit *Storage*-Lysispuffer, um dann die in *Storage*-Lysispuffer aufgenommenen Lysate hinzu zu pipettieren und die Proben über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler zu inkubieren. Am nächsten Morgen wurde erneut dreimal mit *Storage*-Lysispuffer gewaschen. Abschließend wurden 25µl 2 x Lämmli-Probenpuffer zum Sediment pipettiert. Nach 5minütigem Aufkochen bei 95°C wurden die Proteine entsprechend ihrer molaren Masse, in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Folgende biotinylierten Peptide (freundlicherweise von Dr. J. Schneider-Mergener (Berlin) zur Verfügung gestellt) wurden verwendet:

OSMR Y(p)837:	Biotin-βA-ELTKPNpYLYLLPTE
OSMR Y(p)839:	Biotin-βA-ELTKPNYLpYLLPTE
OSMR Y(p)837Y(p)839:	Biotin-βA-ELTKPNpYLpYLLPTE
OSMR Y(p)861:	Biotin-βA-GPCICFENLTpYNQA
OSMR Y(p)901:	Biotin-βA-KALEKNpYMNSLGEI
OSMR Y(p)917:	Biotin-βA-GETSLNpYVSQLASP
OSMR Y(p)945:	Biotin-βA-APHCSEpYKMQMAVS

<i>Storage</i> -Lysispuffer:	150	mM	NaCl
	50	mM	Tris HCl pH 8,0
	0,1	mM	EDTA
	10	%	Glycerin
	0,5	%	NP40

II.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer molaren Masse (136). Während das in der Lösung befindliche Detergenz SDS die Eigenladung des Proteins überdeckt, wird die Faltung durch Reduktion der Disulfidbrücken mit β-Mercaptoethanol aufgehoben. Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli durchgeführt. Es wurden 7,5%ige und 10%ige Trenngele mit 3%igen Sammelgelen eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte in

einer BioMetra-Kammer für 2-3 h bei konstanter Stromstärke von 30mA. Als Größenstandard diente der *Precision Plus Protein Standard* (Biorad, München).

Acrylamidlösung:	29	%	Acrylamid
	1	%	Bisacrylamid
7,5%iges Trenngel:	7,15	ml	H ₂ O
	3,75	ml	Acrylamidlösung
	3,8	ml	1,5 M Tris HCl pH 8
	150	µl	10% SDS
	12	µl	TEMED
	75	µl	APS
10%iges Trenngel	5,9	ml	H ₂ O
	5	ml	Acrylamidlösung
	3,8	ml	1,5 M Tris HCl pH 8
	150	µl	10% SDS
	12	µl	TEMED
	75	µl	APS
3%iges Sammelgel:	3,4	ml	H ₂ O
	0,83	ml	Acrylamidlösung
	0,63	ml	1,5 M Tris HCl pH 8
	50	µl	10% SDS
	5	µl	TEMED
	40	µl	APS
Elektrodenpuffer:	25	mM	Tris-Base
	192	mM	Glycin
	0,1	%	SDS

II.4.7 Elektro-Western Blot

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden zur Detektion mit Hilfe des „*semidry*-Western Blot“-Verfahrens auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Insgesamt wurden 12 Whatman-Papiere und die PVDF-Membran genau auf die Gelgröße zugeschnitten. Im Folgenden musste die PVDF-Membran für 5 sec in 100% Methanol getaucht, weitere 5 min gewässert und dann 15 min in Anoden-Puffer-II äquilibriert werden. Währenddessen wurde das Gel für mindestens 5 min in Kathoden-Puffer äquilibriert. Nach kurzem Tränken der Whatman-Filter mit den unten angegebenen Puffern erfolgte der Aufbau des Blots:

1. Anode des Blotapparates
2. 5 Whatman-Filter getränkt mit Anoden-Puffer-I
3. 2 Whatman-Filter getränkt mit Anoden-Puffer-II
4. PVDF-Membran äquibriert in Anoden-Puffer-II
5. Polyacrylamidgel äquibriert in Kathoden-Puffer
6. 5 Whatman-Filter getränkt mit Kathoden-Puffer
7. Kathode des Blotapparates

Die gerade aufgeführten Komponenten wurden luftblasenfrei aufeinandergelegt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte bei $0,8\text{mA/cm}^2$ für 1 h bei einem Andruckgewicht von 1kg.

Anoden-Puffer-I:	0,3 20	M %	Tris-Base Methanol
Anoden-Puffer-II:	0,02 20	M %	Tris-Base Methanol
Kathoden-Puffer:	0,4 20	M %	6-Aminohexansäure Methanol

II.4.8 Detektion präzipitierter Proteine mit Hilfe des Immunblots

Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurden die freien Bindungsstellen 15 min mit 10%iger BSA- oder Milchpulverlösung in TBS-N blockiert, die Membran zweimal für 15 sec mit TBS-N gespült und 1 h bei Raumtemperatur mit einer 1:200–1:1000 Verdünnung eines entsprechenden Antikörpers in TBS-N inkubiert. Nach zwei kurzen Spülschritten und dreimaligem Waschen für 1 x 15 min und 2 x 5 min erfolgte die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:3000–1:10000 in TBS-N für mindestens 30 min bei Raumtemperatur. Überschüssiges Antiserum wurde durch neuerliche Waschschrte von 2 x 15 min mit TBS-N entfernt. Letztlich war eine Detektion der Proteine in einer anschließenden *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Reaktion (Amersham, Freiburg) möglich. Diese erfolgte, nachdem die Membran 1 min lang im Detektionsgemisch inkubiert, luftblasenfrei in

Folie verpackt und zwischen 10 sec und 30 min auf einen Röntgenfilm in einer Expositionskassette gelegt wurde.

Um weitere Detektionen durchführen zu können, wurde die Membran nach Abschluss der ersten Detektion 30 min lang in Strippingpuffer oder alternativ über Nacht in London-*strip* inkubiert und anschließend mindestens zweimal mit TBS-N gewaschen.

TBS-N:	10	ml/l	2M Tris Base
	27	ml/l	5M NaCl
	10	ml/l	Nonidet P-40
		pH	7,6

Strippingpuffer:	62,5	mM	Tris HCl pH 6,7
	2	%	SDS
	0,78	%	β -Mercaptoethanol

Londonstrip:	2	M	Glycin pH 2,5 + Teelöffel SDS/Blot
--------------	---	---	------------------------------------

II.4.9 Durchflusszytometrie

Die Oberflächenexpression von Transmembranproteinen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit PBS/EDTA-Lösung (0,01M EDTA in PBS) von den Platten gelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Dieser und alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C mit entsprechend vorgekühlten Puffer n durchgeführt. Etwa 10^6 Zellen wurden anschließend in 100 μ l FACS-Puffer mit einer 1:100 Verdünnung eines spezifischen Antikörpers gegen den Extrazellulärbereich der zu analysierenden Rezeptoren resuspendiert und 30 min inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 3ml FACS-Puffer gewaschen und zur Detektion der an die Zellen gebundenen Antikörper mit einer Suspension aus 100 μ l FACS-Puffer und 1 μ l entsprechendem R-Phycoerythrin-konjugiertem Zweitantikörper für weitere 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach abschließendem Waschen mit 3ml FACS-Puffer wurden 10^4 Zellen durchflusszytometrisch in einem FACScalibur (Becton Dickinson) analysiert.

FACS-Puffer:	5	%	FKS
	0,1	%	NaN ₃
	in	PBS	

II.4.10 ELISA

Der ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) stellt ein Analyseverfahren dar, mit dessen Hilfe exprimierte Proteine in Zellüberständen nachgewiesen werden können.

Zunächst wurde die Matrix der Mikrotiterplatte über Nacht mit jeweils 100µl/Vertiefung *capture*-Antikörper (2µg/ml) beschichtet. Nach drei Waschzyklen wurden dann verbliebene freie Bindungsstellen durch Zugabe von 0,1%iger BSA-Lösung in PBS für 1 h bei 37°C abgesättigt. Nach erneuten Waschschrritten wurden je 100µl/*well* Kulturüberstand und 10µl/*well* biotinylierter *detection*-Antikörper (2ng/ml) in die Mikrotiterplatte gegeben. Als Referenzwert diente eine Verdünnungsreihe mit dem entsprechenden rekombinanten Protein. Zur Ausbildung der Immunkomplexe wurden die ELISA-Platten für 2 h bei 37°C inkubiert. Zum Nachweis dieser Komplexe wurden daraufhin 100µl 0,001%iges Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Sigma, Eggenstein) in die *wells* pipettiert und für 45 min bei RT inkubiert. Nach neuerlichen drei Waschzyklen erfolgte die Zugabe von 100µl Entwicklerlösung/*well*. Das Enzym HRP katalysiert die Umwandlung des chromogenen Substrates Tetramethylbenzidin (TMB). Dies wird durch einen Farbumschlag von farblos nach blau deutlich. Die Intensität der Farbreaktion verhält sich proportional zum Anteil des zu analysierenden Proteins in der Probe. Nach 10 bis 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 100µl/*well* 2M Schwefelsäure gestoppt. Die Extinktion wurde bei 492nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

Blockierungslösung:	1	%	BSA in PBS
---------------------	---	---	------------

Waschpuffer:	0,05	%	Tween 20 in PBS
--------------	------	---	-----------------

ELISA-Entwicklungslösung:	110	µl	TMB (3,5,3',5'-Tetramethylbenzidin; 10mg/ml in DMSO
	11	ml	0,1M Na-Acetat-Puffer; pH 5,5
	11	µl	Wasserstoffperoxidlösung (3% H ₂ O ₂)

III. Ergebnisse

III.1 Studien zur OSM-induzierten STAT5-Aktivierung

Oncostatin M gehört zu den stärksten Aktivatoren des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs. Nach ligandeninduzierter Rezeptordimerisierung werden JAK1, JAK2 und TYK2 aktiviert, um dann ihrerseits die Phosphorylierung von Rezeptortyrosinen im zytoplasmatischen Bereich von gp130 und dem OSMR zu vermitteln. An diese phosphorylierten Tyrosinreste binden dann STAT-Faktoren über ihre SH2-Domänen und übermitteln in aktiviertem Zustand das Signal in den Zellkern. Im Gegensatz zur signaltransduzierenden Kette gp130, an die vorwiegend STAT1 und STAT3 rekrutiert werden, ermöglicht der OSMR eine zusätzliche Aktivierung von STAT5.

Die genauen molekularen Mechanismen, die letztlich zur OSM-abhängigen STAT5-Phosphorylierung sowie zur Aktivierung von STAT1 und STAT3 führen, sind bislang unbekannt und sollten im ersten Teil dieser Arbeit untersucht werden.

III.1.1 OSM vermittelt die Translokation von aktiviertem STAT1, STAT3 und STAT5 in den Zellkern

Wie erwartet und schon in einigen anderen Arbeiten gezeigt (69,80,92,137), führt die Stimulation von humanen dermalen Fibroblasten (HDFs) mit 20ng/ml OSM zur Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT5 (Abb.5A). Im Gegensatz zur STAT3-Aktivierung, die über den gesamten Stimulationszeitraum von 16 h gut detektierbar ist (Abb.5A; untere Blots), werden STAT5 und STAT1 deutlich transienter phosphoryliert. Nach einer anfänglich verstärkten Tyrosinphosphorylierung ist das Signal bereits nach kurzer Zeit nicht mehr nachweisbar (Abb.5A; obere und mittlere Blots). Um die Relevanz der OSM-induzierten STAT-Phosphorylierung näher zu beleuchten, wurde im Folgenden die Translokation der aktivierten Transkriptionsfaktoren in den Zellkern untersucht (Abb.5B). HDFs wurden für die angegebenen Zeiträume mit OSM stimuliert und anschließend fraktioniert, sodass eine nukleäre, eine zytoplasmatische und eine

Plasmamembranfraktion gesammelt werden konnten. Die phosphorylierten Formen aller drei STAT-Faktoren können daraufhin sowohl in der zytosolischen, als auch in der nukleären Fraktion nachgewiesen werden. Wie schon im Experiment zuvor stellt STAT5 den am deutlichsten transient aktivierten Transkriptionsfaktor dar. Die OSM-induzierte Phosphorylierung ist bereits nach 60 min nicht mehr in der Kernfraktion detektierbar (Abb.5B; oberster Blot).

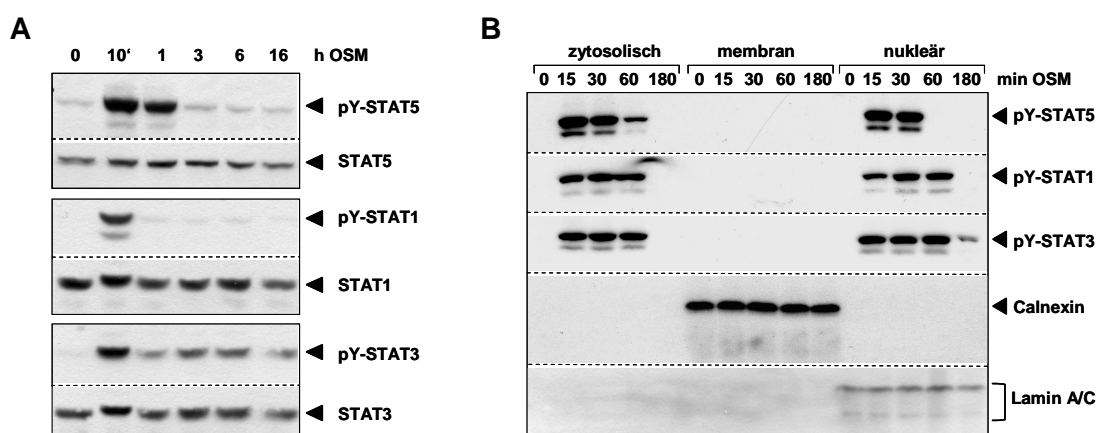


Abb.5: Oncostatin M aktiviert STAT1, STAT3 sowie STAT5 und induziert deren Translokation in den Zellkern

(A) Humane dermale Fibroblasten (HDFs) wurden für die angezeigten Zeiträume mit 20ng/ml OSM stimuliert. Anschließend wurden Lysate hergestellt und elektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Immundetektion mit polyklonalen, phosphospezifischen Antikörpern gegen STAT1, STAT3 und STAT5. Für die Gegenfärbung wurden spezifische polyklonale Antikörper gegen STAT1 und STAT5 bzw. ein monoklonaler Antikörper gegen STAT3 benutzt. **(B)** HDFs wurden für die beschriebenen Zeiten mit 20ng/ml OSM stimuliert und anschließend lysiert und fraktioniert. Die Fraktionen wurden in einem 10%igen PAA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Immundetektion erfolgte mit phosphospezifischen Antikörpern gegen STAT1, STAT3 und STAT5. Calnexin und Lamin A/C dienen als Marker für die nukleäre bzw. für die Membranfraktion.

III.1.2 Die OSM-induzierte STAT5-Phosphorylierung ist OSMR-abhängig

Humane dermale Fibroblasten exprimieren gp130, den LIFR und auch den OSMR. Dies bedeutet, dass Oncostatin M in diesen Zellen sowohl über den Typ-I-Rezeptorkomplex (gp130/LIFR), als auch über den Typ-II-Rezeptorkomplex (gp130/OSMR) signalisieren kann. Um das Potential beider Rezeptorkomplexe

hinsichtlich einer möglichen STAT5-Aktivierung vergleichen zu können, wurden HDFs mit ansteigenden Mengen OSM oder LIF stimuliert (Abb.6A). Während bereits eine Konzentration von 1ng/ml OSM ausreicht, um eine deutlich detektierbare STAT5-Aktivierung hervorzurufen (Abb.6A; Spur 7), muss mit mehr als 50ng/ml LIF stimuliert werden, um phosphoryliertes STAT5 nachzuweisen (Abb.6A; Spur 1). Um herauszufinden, ob die OSM-induzierte STAT5-Aktivierung vornehmlich über einen der beiden Rezeptorkomplexe OSMR/gp130 bzw. LIFR/gp130 vermittelt wird, wurden die Zellen mit LIF-05 vorbehandelt. Diese mutierte Form von LIF kann zwar noch an den LIFR binden, verhindert aber die weitere Rekrutierung von gp130, sodass OSM im Folgenden nur über den Typ-II-Rezeptorkomplex signalisieren kann (137). Interessanterweise wird die OSM-induzierte STAT5-Phosphorylierung nicht unterbunden (Abb.6B; Spur 4) und somit über den OSMR vermittelt. Im Gegensatz dazu ist die LIF-induzierte STAT5-Aktivierung nicht mehr detektierbar (Abb.6B; Spur 8).

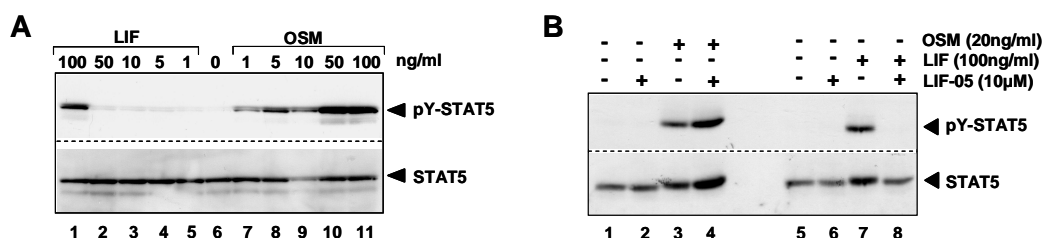


Abb.6: Die OSM-induzierte STAT5-Aktivierung wird über den Typ-II-Rezeptorkomplex vermittelt

(A) HDFs wurden 30 min mit ansteigenden Mengen OSM und LIF stimuliert und daraufhin lysiert. Gleiche Proteinmengen wurden elektrophoretisch auf einem PAA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Immundetektion erfolgte mit einem spezifischen, polyklonalen Antikörper gegen phosphoryliertes STAT5 bzw. einem polyklonalen Antikörper gegen STAT5 in der Beladungskontrolle. **(B)** Nach 30minütiger Inkubation mit 10μM LIF-05 wurden HDFs mit 20ng/ml OSM bzw. 100ng/ml LIF für 30 min stimuliert. Anschließend gewonnene Lysate wurden über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt und STAT5 in einer Immundetektion wie in (A) beschrieben detektiert.

III.1.3 Der humane OSMR vermittelt die Aktivierung von STAT5 über das Doppelyrosinmotiv Y₈₃₇LY₈₃₉L

STAT-Faktoren werden über ihre SH2-Domänen an phosphorylierte Tyrosinmotive innerhalb von Rezeptorketten rekrutiert, sodass bereits spezifische Rekrutierungs-

motive für die diversen STAT-Isoformen beschrieben werden konnten. Um zu untersuchen, welche Tyrosinmotive innerhalb des OSMRs die diversen STAT-Faktoren binden, konnte auf ein bereits lange etabliertes, chimäres Rezeptorsystem zurückgegriffen werden (54,80). Dabei ist der transmembrane und der intrazelluläre Teil von gp130 bzw. des OSMRs mit dem extrazellulären Bereich der IL-5R α - bzw. der IL-5R β -Rezeptorkette fusioniert. Durch IL-5-Stimulation wird dann in transfizierten Zellen die Bildung eines Rezeptorkomplexes induziert und die gp130- bzw. OSMR-abhängige Signaltransduktion vermittelt. Um letztere eingehender zu analysieren, wurden nur IL-5R α -Chimären transfiziert, in denen alle C-terminal von der Box1/2-Region gelegenen Tyrosinmotive von gp130 zu Phenylalanin mutiert sind (α /gp130YFFFFFF). So wird eine gp130-vermittelte Signaltransduktion unterbunden, während die über den OSMR-induzierte Signalkaskade weiterhin untersucht werden kann.

Mit entsprechenden chimären Konstrukten stabil transfizierte HEK293T-FlpIn-Zellen wurden dann zur Induktion der Rezeptorketten über Nacht mit Doxycyclin induziert und anschließend mit IL-5 stimuliert (Abb.7). Wie schon in früheren Arbeiten angedeutet (137), wird die OSMR-induzierte Aktivierung von STAT3 über die beiden Tyrosinreste Y₉₁₇ und Y₉₄₅ des OSMR vermittelt (Abb.7A; obere Blots), die beide Teil der typischen STAT3-Rekrutierungssequenz (p)YXXQ sind. Die Punktmutation dieser Tyrosine unterbindet nicht nur die komplette STAT3-Phosphorylierung (Abb.7A; obere Blots; Spuren 4 und 6), sondern folglich auch die Induktion des STAT3-Zielgens SOCS3 auf mRNA- und Proteinebene (Abb.7A; mittlere und untere Blots). Im Gegensatz dazu sind die beiden Tyrosine Y₉₁₇ und Y₉₄₅ nicht nur für die OSM-induzierte STAT1-Phosphorylierung, sondern ebenso für die Induktion des klassischen STAT1-Zielgens IRF1 bedeutungslos (Abb.7B). Sogar das Mutieren aller C-terminal von der Box1/2-Region des OSMR gelegenen Tyrosinmotive führt nicht zur Unterdrückung der STAT1-Phosphorylierung (Abb.7B; Spur 6). Im Unterschied zur STAT3-Aktivierung wird die OSMR-vermittelte STAT1-Phosphorylierung also völlig unabhängig von Rezeptortyrosinen induziert.

Die OSMR-vermittelte Aktivierung von STAT5 verläuft ebenso wie die Aktivierung von STAT3 tyrosinabhängig (Abb.8A; Spur 8).

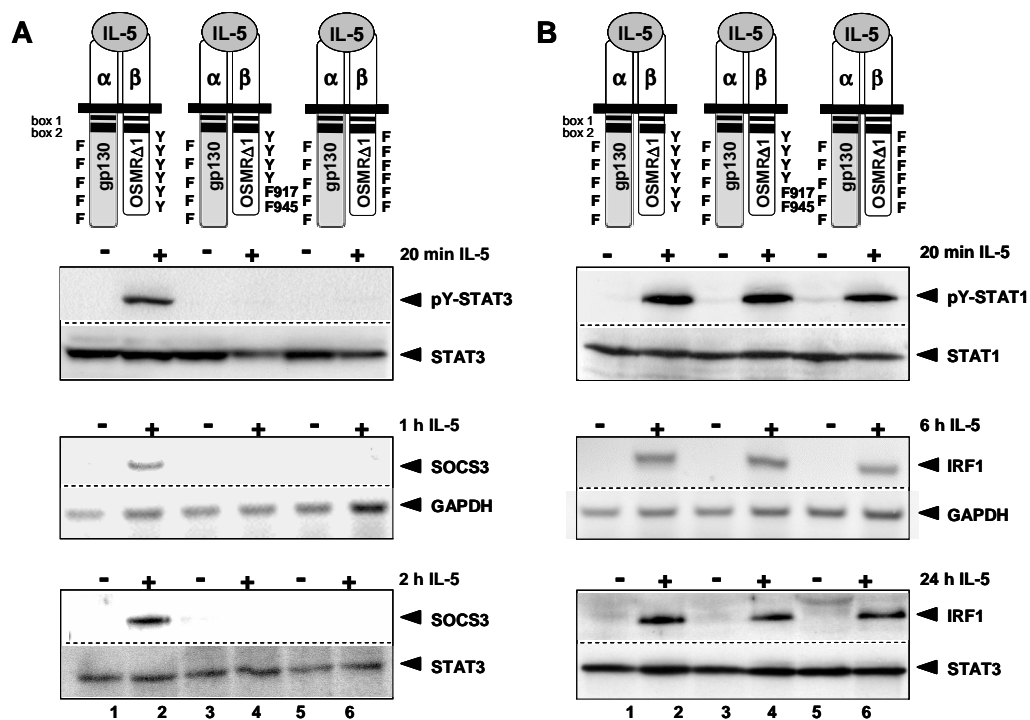


Abb.7: Die OSMR-vermittelte STAT1-Aktivierung erfolgt receptortyrosinunabhängig

(A) und (B) Die dargestellten chimären Rezeptoren wurden in stabil transfizierten HEK293T-FlpInTRex-Zellen für 24 h mit 10ng/ml Doxycyclin induziert und anschließend für die angegebenen Zeiträume mit 10ng/ml IL-5 stimuliert. Die Zellen wurden dann lysiert und die Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt, um auf eine PVDF-Membran geblottet zu werden. Die Western Blots wurden mit spezifischen Antikörpern gegen phospho-STAT3, STAT3, SOCS3, phospho-STAT1, STAT1 und IRF1 gefärbt. Die SOCS3- bzw. IRF1-mRNA-Spiegel wurden nach durchgeführter RNA-Extraktion mit Hilfe einer RT-PCR detektiert (mittlere Blots).

Interessanterweise enthält der OSMR das Doppeltirosinmotiv Y₈₃₇LY₈₃₉L, welches Teil eines typischen STAT5-Bindemotivs (YΦYΦ; Φ entspricht dabei einem hydrophoben Aminosäurerest) ist, das auch in den Rezeptoren bekannter STAT5-Aktivatoren wie Epo, IL-2 oder GM-CSF vorkommt. Aus diesem Grund wurden die beiden Tyrosine Y₈₃₇ und Y₈₃₉ im OSMR punktmuiert und die entsprechenden chimären Rezeptoren transient in HEK293T-Zellen exprimiert. In der Tat ist nach der Mutation beider Tyrosine keine STAT5-Phosphorylierung mehr detektierbar (Abb.8A; Spur 4). Zur internen Kontrolle wurden HEK293T-Zellen im Weiteren mit einem OSMR-Konstrukt transfiziert, in dem das Tyrosin Y₈₆₁ punktmuiert wurde. Dieses Tyrosin des OSMR ist bereits als spezifische Rekrutierungsstelle für das

Adapterprotein Shc beschrieben (54) und vermittelt die Aktivierung der MAP-Kinasen, während ihm für die Phosphorylierung von STAT-Faktoren keine Bedeutung zukommt. Das bestätigt auch das vorliegende Ergebnis. Die IL-5-induzierte STAT5-Aktivierung über den β /OSMR $Y_{861}F$ Stop1 entspricht der STAT5-Phosphorylierung über den β /OSMR Stop1 (Abb.8A; Spuren 2 und 6). Um die physiologische Bedeutung der über das Doppelyrosinmotiv-vermittelten STAT5-Aktivierung zu unterstreichen, sollte in einem vergleichbaren Transfektionsansatz die Expression des STAT5-Zielgens CIS untersucht werden (Abb.8B). Während die Stimulation eines mit dem Wildtyp vergleichbaren Rezeptors die Induktion von CIS-mRNA ermöglicht (Abb.8B; Spur 2), kann in Zellen, die das OSMR-Rezeptorkonstrukt mit der Doppelyrosinmutante (β /OSMR $Y_{837/839}F$ Stop1) exprimieren, keine CIS-mRNA mehr induziert werden (Abb.8B; Spur 4).

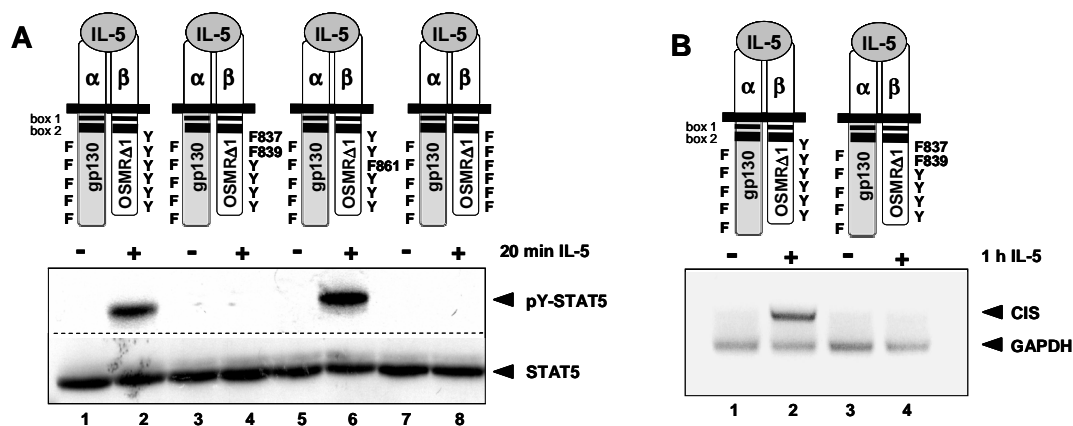


Abb.8: Die STAT5-Phosphorylierung wird über das Doppelyrosinmotiv Y_{837}/Y_{839} des humanen OSMR vermittelt

(A) Die dargestellten chimären Rezeptoren wurden transient in HEK293T-Zellen exprimiert und anschließend für die angegebenen Zeiträume mit 10ng/ml IL-5 stimuliert. Die Zellen wurden dann lysiert und die Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt, um auf eine PVDF-Membran geblottet zu werden. Die Western Blots wurden mit spezifischen Antikörpern gegen phospho-STAT5 und STAT5 gefärbt. (B) Die CIS-mRNA-Spiegel wurden nach durchgeführter RNA-Extraktion mit Hilfe einer RT-PCR detektiert.

Um die bis hier mit Hilfe von chimären Rezeptoren erhaltenen Ergebnisse in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen, wurden Peptidpräzipitationen durchgeführt (Abb.9). Die genutzten Peptide enthalten alle C-terminal der Box1/2-Region

gelegenen phosphorylierten Tyrosine des OSMR mit Ausnahme des Tyrosins Y₉₇₈. Dieses Tyrosin stellt die zweitletzte Aminosäure des OSMR dar und ist daher nicht befähigt, Interaktionen mit SH2-Domänen-enthaltenden Proteinen einzugehen, die mindestens drei weitere C-terminal gelegene Aminosäuren erfordern. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Peptid-präzipitationen, die ausnahmslos die durch die Expression der mutierten Rezeptoren erhaltenen Resultate bestätigen. STAT5 kann mit Peptiden präzipitiert werden, die mindestens eines der phosphorylierten Tyrosine Y₈₃₇ und Y₈₃₉ enthalten. Die einzelnen Tyrosine innerhalb des Doppelyrosinmotivs verhalten sich dabei redundant. Keines der getesteten phosphotyrosinenthaltenden Peptide kann mit STAT1 interagieren, während STAT3 an die aktivierten Tyrosinmotive Y₉₁₇ und Y₉₄₅ bindet.

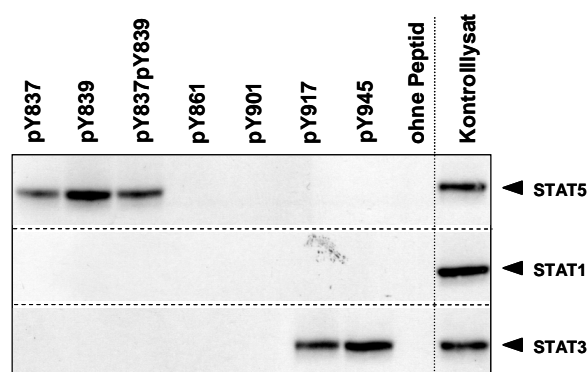


Abb.9: Die Bedeutung diverser OSMR-Rezeptortyrosinmotive für die Aktivierung von STAT-Faktoren

HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für STAT1, STAT3 und STAT5 transfiziert. Die präparierten Lysate wurden in Präzipitationen mit biotinylierten Peptiden eingesetzt, die die angezeigten phosphorylierten OSMR-Tyrosine und die jeweils umgebenden Aminosäuresequenzen enthielten. Mit Hilfe von NeutrAvidin gekoppelter Agarose wurden die Peptid-STAT-Komplexe isoliert, elektrophoretisch über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Western Blots wurden mit spezifischen Antikörpern gegen STAT1, STAT3 und STAT5 gefärbt.

III.1.4 Der murine OSMR vermittelt die Aktivierung von STAT5 mit Hilfe rezeptorassoziierter Janus Kinasen

Ein Vergleich der OSMR-Gensequenzen verschiedener Spezies zeigt, dass die Rekrutierungsstellen für STAT3 in allen Rezeptoren konserviert sind. Im Gegensatz dazu fehlt sowohl dem murinen OSMR, als auch dem OSM-Rezeptor

der Ratte das im humanen System für die STAT5-Phosphorylierung wichtige Doppelyrosinmotiv (Abb.50). Dennoch zeigt eine Gegenüberstellung von OSM-induzierten STAT5-Phosphorylierungskinetiken in humanen und murinen Fibroblasten vergleichbare Ergebnisse (Abb.10A).

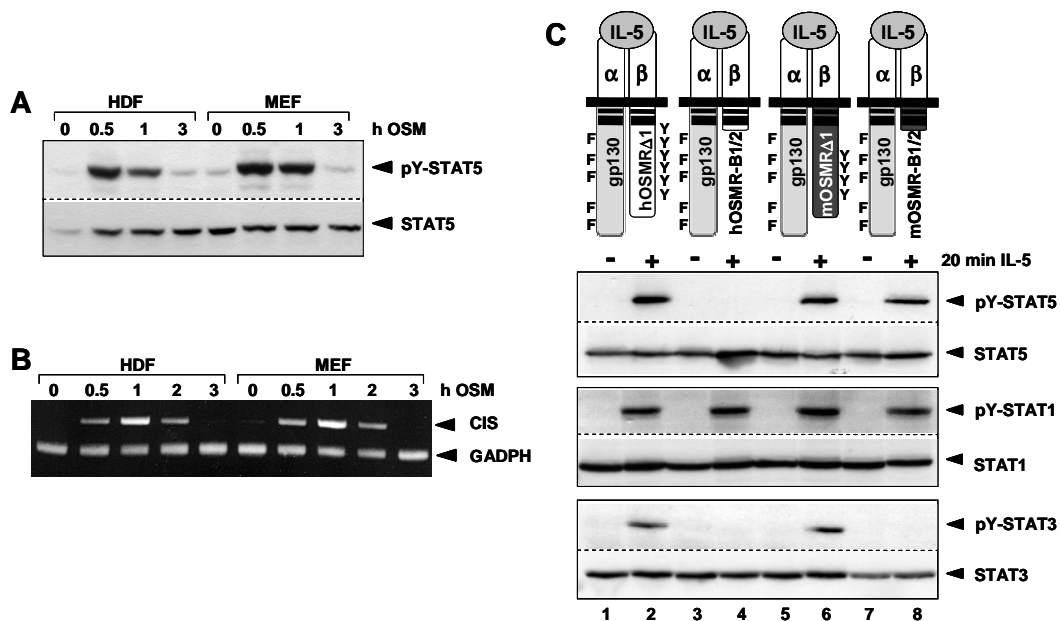


Abb.10: Humaner und muriner OSMR nutzen verschiedene Wege, um STAT5 zu aktivieren
(A) HDFs und MEFs wurden mit 20ng/ml humanem bzw. murinem OSM für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Die Lysate wurden über ein PAA-Gel aufgetrennt, dann auf eine PVDF-Membran geblottet und die Membran letztlich mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen STAT5 gefärbt. Für die Gegenfärbung wurde ein polyklonaler Antikörper gegen STAT5 benutzt. **(B)** HDFs und MEFs wurden wie in (A) stimuliert. Nach erfolgter RNA-Extraktion wurden die CIS-mRNA-Spiegel mit Hilfe einer RT-PCR ermittelt. **(C)** HEK293T-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für STAT5 und den dargestellten chimären Rezeptoren transfiziert. Nach einer 20minütigen Stimulation mit IL-5 (10ng/ml) wurden die Zellen lysiert und mit Hilfe eines Western Blots aufgearbeitet. Die Membranen wurden mit phosphospezifischen Antikörpern gegen STAT1, STAT3 und STAT5 detektiert und mit Antiseren gegengefärbt, die die Proteine unabhängig von ihrem Phosphorylierungsstatus erkennen.

Identisches gilt auch für die Induktion des STAT5-Zielgens CIS (Abb.10B). Da der murine OSMR im Vergleich zum humanen Rezeptor keine zusätzlichen Tyrosinmotive beinhaltet, stellte sich im Folgenden die Frage, ob der murine OSMR im Gegensatz zum humanen die Fähigkeit besitzt, STAT5 tyrosinunabhängig zu aktivieren. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden HEK293T-Zellen mit verkürzten Varianten des humanen und murinen OSMR transfiziert (β /OSMR box1/2 und β /muOSMR box1/2), die nur noch den Bereich

der Box1/2-Region und damit keine C-terminal gelegenen Tyrosinmotive mehr besitzen (Abb.10C). Den vorangegangenen Experimenten entsprechend ist nach IL-5-Stimulation über die jeweils langen, chimären OSMR-Konstrukte eine STAT5-Phosphorylierung detektierbar (Abb.10C; obere Blots; Spuren 2 und 6). Über das verkürzte humane OSMR-Konstrukt kann aufgrund des fehlenden Doppeltirosinmotivs Y₈₃₇/Y₈₃₉ keine Aktivierung von STAT5 erreicht werden (Abb.10C; obere Blots; Spur 4). Im Gegensatz dazu ist die verkürzte Version des murinen OSMR nach IL-5-Stimulation auch ohne Rezeptortyrosine befähigt, STAT5 zu phosphorylieren (Abb.10C; obere Blots; Spur 8). Die transiente Transfektion von murinen Fibroblasten mit den gleichen chimären Rezeptoren führt zu einem vergleichbaren Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zur STAT5-Phosphorylierung erfolgt die Aktivierung von STAT1 und STAT3 im humanen und murinen System über vergleichbare molekulare Mechanismen. Wie schon zuvor für den humanen Rezeptor gezeigt, gilt auch für den murinen OSMR, dass er die STAT1-Aktivierung tyrosinunabhängig und die STAT3-Phosphorylierung tyrosinabhängig vermittelt (Abb.10C; mittlere und untere Blots; Spuren 4 und 8).

III.1.5 Die Box2-Region des murinen OSMR ist für die tyrosin-unabhängige STAT5 Aktivierung verantwortlich

Die genauere Analyse der Box1/2-Region des humanen und murinen OSMR zeigt, dass der gesamte Bereich der Box1-Region in beiden Spezies hoch konserviert ist (Abb.11A). Dagegen sind der Interboxbereich und die Box2-Region deutlich weniger konserviert. Um herauszufinden, welche Bereiche des verkürzten murinen OSMR letztlich die Aktivierung von STAT5 ermöglichen, wurden neue IL-5-Chimären generiert, in denen entweder die Interbox oder die Box2-Region zwischen humanem und murinem OSMR ausgetauscht wurden (Abb.11A; Konstrukte 3-6). Diese neuen chimären OSMR-Konstrukte wurden dann zusammen mit der zuvor eingesetzten gp130-Chimäre (α /gp130YFFFFF) transient in HEK293T-Zellen exprimiert. Ein Austausch der Interboxregion führt zu keiner veränderten Präferenz der STAT5-Phosphorylierung. Der humane Rezeptor ist trotz muriner Interboxregion nicht befähigt, STAT5 zu aktivieren (Abb.11B; Spur 6),

während der murine Rezeptor auch mit humaner Interboxregion STAT5 phosphorylieren kann (Abb11B; Spur 12). Der Austausch der OSMR-Box2-Regionen hingegen erzeugt einen humanen OSM-Rezeptor mit den Kapazitäten eines murinen OSMR, sodass die Aktivierung von STAT5 nun auch ohne Rezeptortyrosine möglich ist (Abb.11B; Spur 4).

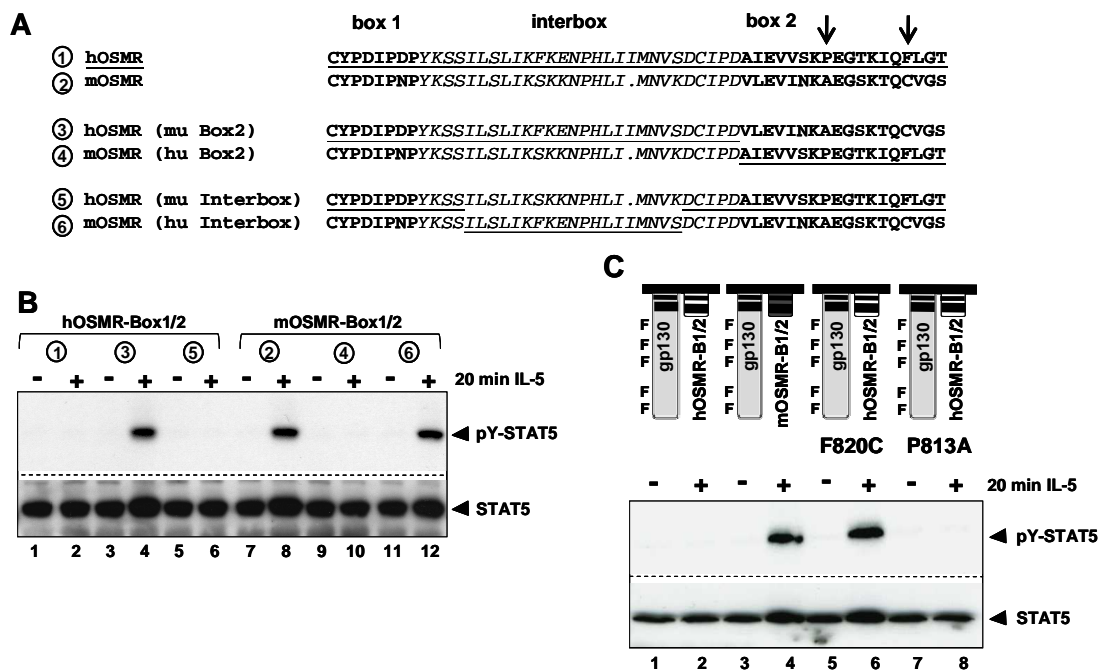


Abb.11: Die Box2-Region des murinen OSMR ermöglicht eine tyrosinunabhängige STAT5-Phosphorylierung

(A) Schematische Gegenüberstellung der humanen und murinen Box1/2-Regionen. Die Aminosäuresequenzen sind im Einbuchstabencode dargestellt. Fettgedruckte Buchstaben repräsentieren Aminosäuren in den Box1- und Box2-Regionen. Kursiv dargestellte Buchstaben stehen für Aminosäuren der Interboxen. Um zwischen humaner und muriner Sequenz differenzieren zu können, sind die humanen Aminosäuren unterstrichen. (B) und (C) HEK293T-Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für STAT5 und den dargestellten chimären Rezeptoren transfiziert. 24 h später wurden die Zellen 20 min mit 10ng/ml IL-5 stimuliert. Die Gesamtzelllysate wurden jeweils über Western Blots aufgearbeitet. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen phospho-STAT5 und STAT5.

Im reziproken Versuchsansatz, in dem die Box2-Region des murinen Rezeptors durch die humane Box2-Region ersetzt wurde, verliert der murine OSMR seine Fähigkeit, STAT5 tyrosinunabhängig zu phosphorylieren (Abb11B; Spur 10).

Eine nähere Betrachtung der 18 Aminosäuren langen Box2-Region im humanen bzw. murinen OSMR verdeutlicht zwei auffällige Unterschiede in der

Primärstruktur beider Spezies: P813A und F820C. Um zu analysieren, ob der Austausch dieser Aminosäuren tatsächlich für eine mögliche STAT5-Phosphorylierung von Bedeutung sein kann, wurden die beiden Aminosäuren im humanen Rezeptor so punktmutiert, dass sie ihrem Gegenstück im murinen OSMR entsprechen. Diese Rezeptorchimären wurden wiederum gemeinsam mit der bereits zuvor verwendeten gp130-Chimäre in HEK293T-Zellen exprimiert. Nach erfolgter IL-5-Stimulation zeigt sich, dass tatsächlich der einzelne Aminosäureaustausch von Phenylalanin F₈₂₀ zu Cystein dem verkürzten humanen OSMR eine Aktivierung von STAT5 ermöglicht. Diese Phosphorylierung von STAT5 gleicht der, die sich auch über die murine Rezeptorvariante beobachten lässt (Abb.11C; Spuren 4 und 6). Im Gegensatz dazu hat die Punktmutation von Prolin P₈₁₃ zu Alanin keinen Effekt auf die STAT5-Aktivierung (Abb.11C; Spur 8).

III.1.6 Die F₈₂₀C-Mutation in der Box2-Region des humanen OSMR beeinflusst die Rekrutierung der Janus Kinasen

Um die molekularen Mechanismen zu identifizieren, die dem murinen OSMR die Fähigkeit verleihen, STAT5 tyrosinunabhängig zu phosphorylieren, sollte im Weiteren das Aktivierungsprofil von JAK1 und JAK2 über den humanen und murinen OSMR verglichen werden. Eine Gegenüberstellung von OSM-stimulierten HDFs und MEFs zeigt, dass murines OSM JAK2 in MEFs stärker aktiviert als humanes OSM in HDFs (Abb.12A; obere Blots). Dagegen wird JAK1 in beiden Zelltypen gleich stark phosphoryliert (Abb.12A; untere Blots). Ein vergleichbares Ergebnis liefert die Transfektion von HEK293T-Zellen mit chimären Rezeptorkonstrukten. Unabhängig von der Länge des OSMRs wird JAK2 nach IL-5-Stimulation deutlich besser über den murinen als über den humanen Rezeptor aktiviert, während sich der Phosphorylierungsgrad von JAK1 in beiden Spezies nicht unterscheidet (Abb.12B). Darüberhinaus lässt sich beobachten, dass aus der Punktmutation von Phenylalanin F₈₂₀ zu Cystein im verkürzten humanen OSMR nicht nur die Fähigkeit zur STAT5-Phosphorylierung, sondern auch eine verstärkte JAK2-Aktivierung resultiert (Abb.12C; obere Blots). Das Aktivierungsprofil für JAK1 bleibt auch hier unverändert (Abb.12C; untere Blots).

Aufgrund der zuletzt erhaltenen Ergebnisse stellte sich die Frage, ob sich der humane und der murine OSMR grundsätzlich in ihrem Potential unterscheiden, JAK1 und JAK2 zu rekrutieren. Die eingebrachte Punktmutation F₈₂₀C könnte die Affinität des humanen OSMR für JAK2 deutlich erhöhen.

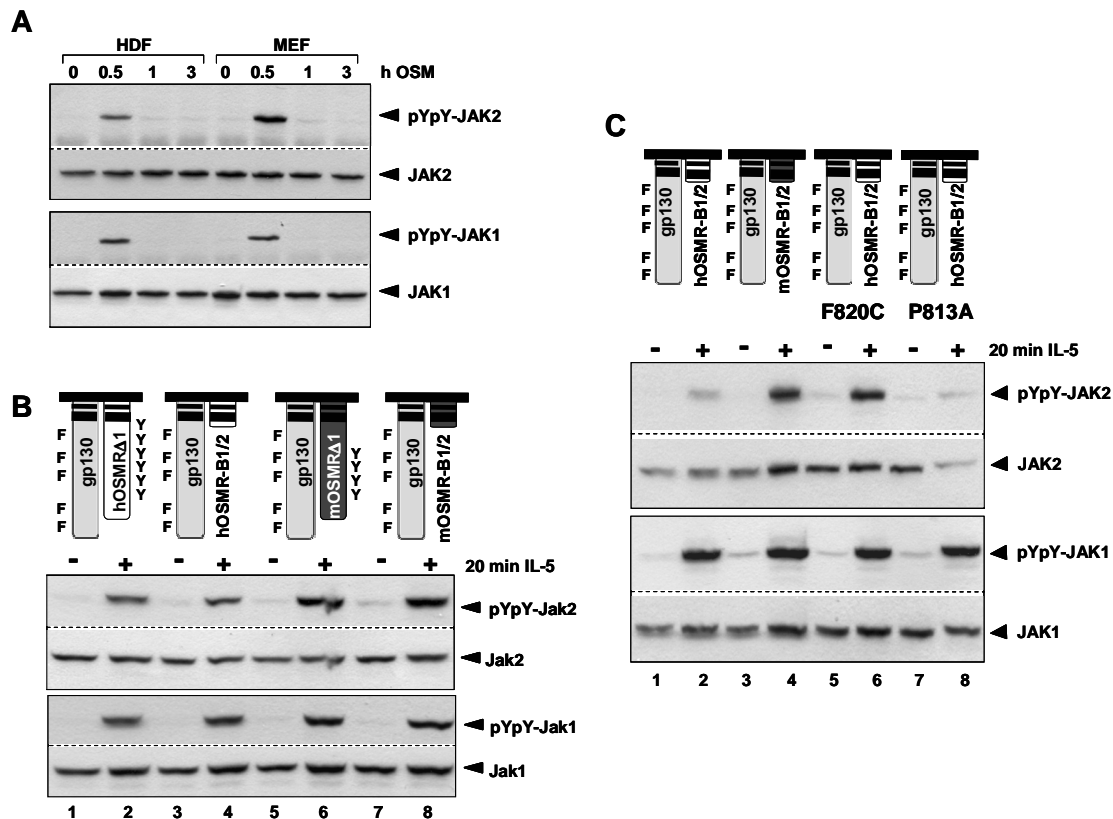


Abb.12: Der murine OSMR vermittelt im Vergleich zum humanen OSMR eine verstärkte JAK2-Aktivierung

(A) HDFs und MEFs wurden mit 20ng/ml humanem bzw. murinem OSM für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Die Lysate wurden über ein PAA-Gel aufgetrennt, dann auf eine PVDF-Membran geblottet und die Membran letztlich mit phosphospezifischen Antikörpern gegen JAK1 und JAK2 gefärbt. Für die Gegenfärbung wurden polyklonale Antikörper gegen JAK1 und JAK2 benutzt. (B) und (C) HEK293T-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für STAT5 und die dargestellten chimären Rezeptoren transfiziert. Nach einer 20minütigen Stimulation mit IL-5 (10ng/ml) wurden die Zellen lysiert und mit Hilfe eines Western Blots aufgearbeitet. Die Membranen wurden mit phosphospezifischen Antikörpern gegen JAK1 und JAK2 detektiert und mit Antiseren gegengefärbt, die die Proteine unabhängig von ihrem Phosphorylierungsstatus erkennen.

Aus diesem Grund wurden mit den dargestellten chimären Rezeptoren transient transfizierte HEK293T-Zellen nach IL-5-Stimulation lysiert und die gewonnenen Lysate in eine Immunpräzipitation gegen die IL-5Rβ-Kette eingesetzt. In der Tat

kann endogenes JAK2 nur mit dem murinen OSMR-Konstrukt und dem humanen OSMR-Konstrukt, das die F₈₂₀C-Mutation aufweist, kopräzipitiert werden (Abb.13A; oberer Blot; Spuren 5 und 7).

Letztlich sollte analysiert werden, ob STAT5 im murinen System möglicherweise direkt von JAK2 zum Rezeptor rekrutiert wird. Daher wurden weiterhin Studien durchgeführt, in denen Janus Kinasen und der Transkriptionsfaktor STAT5 koimmunpräzipitiert werden sollten. Abbildung 13B zeigt, dass keine Assoziation zwischen JAK1 und STAT5 beobachtet werden kann.

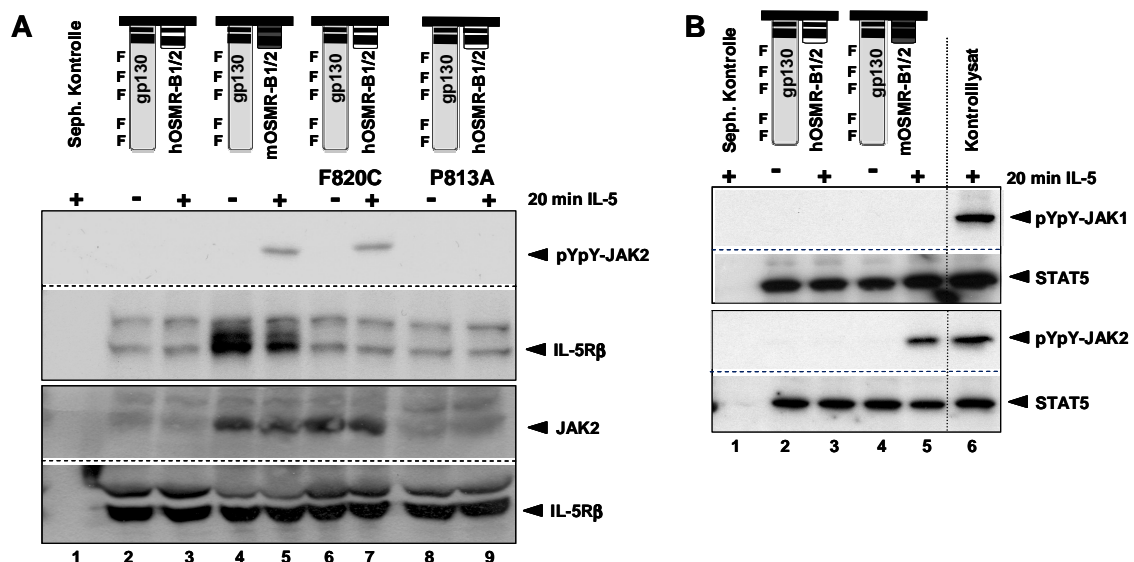


Abb.13: Die Punktmutation F₈₂₀C bewirkt eine verstärkte Rekrutierung von JAK2 an den humanen OSMR

(A) und (B) HEK293T-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für STAT5 und den dargestellten chimären Rezeptoren transfiziert. Nach einer 20minütigen Stimulation mit IL-5 (10ng/ml) wurden die Zellen lysiert und in eine Immunpräzipitation gegen IL-5Rβ bzw. STAT5 eingesetzt. Daraufhin wurden die erhaltenen Präzipitate über ein PAA-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membranen wurden mit phosphospezifischen Antikörpern gegen JAK1 und JAK2 detektiert, daraufhin gestrippt und mit Antiseren gegen JAK2, STAT5 und die IL-5Rβ-Kette gegengefärbt.

Im Gegensatz dazu kann nach einem IL-5-Stimulus über den murinen OSMR, nicht aber über den humanen OSMR, JAK2 mit STAT5 kopräzipitiert werden (Abb.13B; unterer Blot; Spuren 3 und 5).

III.1.7 JAK2 ist für die Phosphorylierung von STAT5 essentiell

Die Phosphorylierung von Rezeptortyrosinen ist unabdingbar, damit sie als Rekrutierungsstellen für SH2-Domänen beinhaltende Proteine agieren können. Da der humane OSMR JAK1, JAK2 und TYK2 binden kann, sollte mit Fibrosarcom-*knock-out*-Zellen analysiert werden, welche Bedeutung die jeweiligen Janus Kinasen für die Phosphorylierung der einzelnen STAT-Faktoren haben. Aus diesem Grund wurden für JAK1 (U4C), JAK2 (γ 2A) und TYK2 (U1A) defiziente Fibrosarcomzellen sowie die parentalen Zellen (2C4 und 2fTGH) mit ansteigenden Mengen OSM stimuliert. Während die Stimulation mit 1ng/ml OSM ausreicht, um STAT3 zu aktivieren, ist eine Konzentration von mindestens 2,5ng/ml OSM erforderlich, um STAT1 und STAT5 zu phosphorylieren (Abb.14A; Spuren 1-6 und 19-24). JAK1-defizienten-Zellen ist es nach Stimulation mit OSM nicht mehr möglich, STAT1 und STAT5, und nur noch eingeschränkt möglich, STAT3 zu aktivieren (Abb.14A; Spuren 7-12). Interessanterweise wird die Phosphorylierung der diversen STAT-Faktoren sehr unterschiedlich durch eine JAK2-Defizienz beeinflusst. Die Aktivierung von STAT1 ist in diesen Zellen uneingeschränkt möglich, sodass der Phosphorylierungsgrad von STAT1 dem der parentalen Fibrosarcomzellen entspricht. Die Tyrosinphosphorylierungen von STAT3 und STAT5 sind dagegen reduziert (Abb.14A; Spuren 13-18). Die TYK2-Defizienz hat keinen Einfluss auf die OSM-induzierte STAT1-, STAT3- und STAT5-Aktivierung (Abb.14A; Spuren 25-30).

Die hier erhaltenen Ergebnisse, die Aufschluss über die Bedeutung einzelner Janus Kinasen für die Phosphorylierung der STAT-Faktoren geben, wurden durch diverse Inhibitorstudien erhärtet. So blockiert der JAK Inhibitor 1, der gegen alle drei Janus Kinasen gerichtet ist, die OSM-induzierte Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT5 (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu bewirkt die Inkubation von parentalen Fibrosarcomzellen bereits mit geringen Dosen AG490, einem für JAK2 spezifischen Inhibitor, eine effiziente Unterdrückung der OSM-vermittelten STAT5-Phosphorylierung. Die STAT3-Aktivierung wird dagegen erst beim Einsatz von hohen Konzentrationen AG490 beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

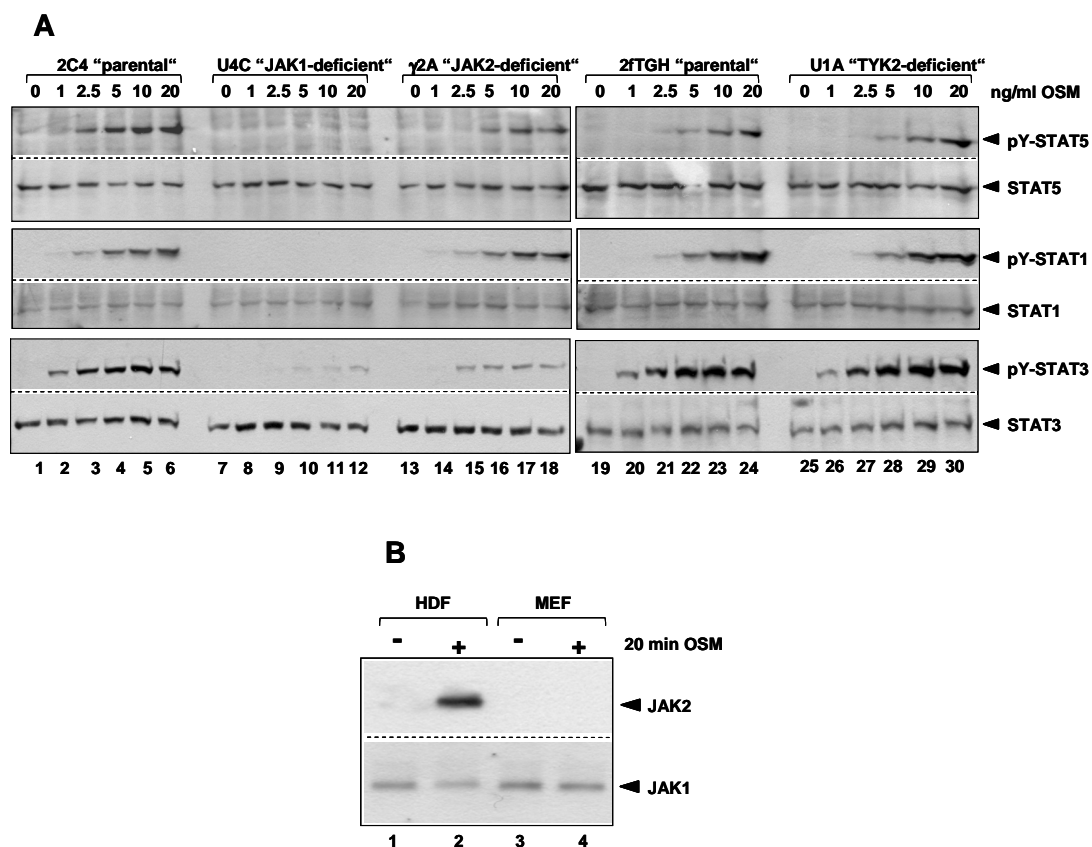


Abb.14: In JAK2-defizienten Fibrosarcomzellen ist die STAT5-Aktivierung reduziert

(A) Fibrosarcomzellen wurden 15 min mit ansteigenden Mengen OSM stimuliert und über einen Western Blot aufgearbeitet. Die Membranen wurden mit phosphospezifischen Antikörpern gegen STAT1, STAT3 und STAT5 gefärbt, daraufhin gestrippt und abschließend mit Antikörpern gegengefärbt, die die Proteine unabhängig von ihrem Phosphorylierungsstatus erkennen (Abbildung freundlicherweise von PD Dr. H. M. Hermanns zur Verfügung gestellt). (B) HDFs und MEFs wurden für 20 min mit 20ng/ml humanem bzw. murinem OSM stimuliert. Gleiche Mengen Lysat wurden in eine Immunpräzipitation mit polyklonalem Antiserum gegen JAK1 eingesetzt. Die Immunkomplexe konnten dann über Protein A-Sepharose aufgereinigt und in einem PAA-Gel aufgetrennt werden. Die Membranen wurden letztlich mit polyklonalen Antiseren gegen JAK1 und JAK2 gefärbt.

Da JAK2 offensichtlich auch am STAT5-Aktivierungsprozess über den humanen OSMR beteiligt ist, sollte abschließend eine potentielle Interaktion von JAK1 und JAK2 im humanen System untersucht werden. Aus diesem Grund wurden HDFs und MEFs mit OSM stimuliert, aus den Lysaten JAK1 immunpräzipitiert und gegen kopräzipitiertes JAK2 detektiert. Wie Abbildung 14B zeigt, wird JAK2 über JAK1 in humanen dermalen Fibroblasten, nicht aber in MEFs rekrutiert (Spur 2).

III.2 Die Bedeutung von CCL1 für die OSM-vermittelte Entzündungsreaktion

Sowohl vom Chemokin CCL1, als auch von den MCP-Familienmitgliedern CCL7 und CCL8 weiß man, dass sie eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Monozyten und T-Lymphozyten zum Entzündungsort spielen (138-140). Bislang ist bekannt, dass ihre verstärkte Expression im Verlauf von entzündlichen Prozessen durch verschiedene Zytokine in unterschiedlichen Zelltypen vermittelt wird. So können diese Chemokine zum Beispiel durch IL-1, TNF α oder IFN γ in Fibroblasten und Epithelzellen, oder aber durch endogenes IL-1 in Monozyten verstärkt induziert werden (141-143).

Ob auch das IL-6-Typ Zytokin Oncostatin M die Fähigkeit besitzt, eine physiologisch relevante Expression dieser Chemokine einzuleiten, ist noch völlig ungeklärt. Erste Hinweise darauf geben jedoch institutsinterne Affymetrix-Mikroarray- und RPA-Daten. Aus diesem Grund sollte im zweiten Teil dieser Arbeit überprüft werden, ob OSM die Expression dieser Chemokine beeinflusst und welche möglichen Signalwege dabei von Bedeutung sein könnten.

III.2.1 Oncostatin M induziert die Expression von CCL1, CCL7 und CCL8 in humanen dermalen Fibroblasten

Um den Effekt von OSM auf die Expression von CCL1, CCL7 und CCL8 in primären humanen dermalen Fibroblasten genauer zu untersuchen, wurden die Zellen für die angegebenen Zeiträume mit 20ng/ml OSM stimuliert und die induzierten mRNA-Spiegel mit Hilfe von RPAs bestimmt (Abb.15A und B). Die Ergebnisse zeigen, dass humanes OSM die Transkription der untersuchten Chemokine zeitabhängig induziert. Die größten Mengen von Chemokin-mRNA sind bereits nach 60minütiger Stimulation detektierbar. Signifikant induzierte Chemokin-mRNAs sind auch 4 h nach OSM-Stimulation noch nachweisbar. Mit Hilfe von ELISAs konnten dann sezernierte Chemokinmengen von bis zu 300pg/ml CCL1 und bis zu 600pg/ml CCL8 im Zellüberstand OSM-behandelter HDFs nachgewiesen werden (Abb.15C).

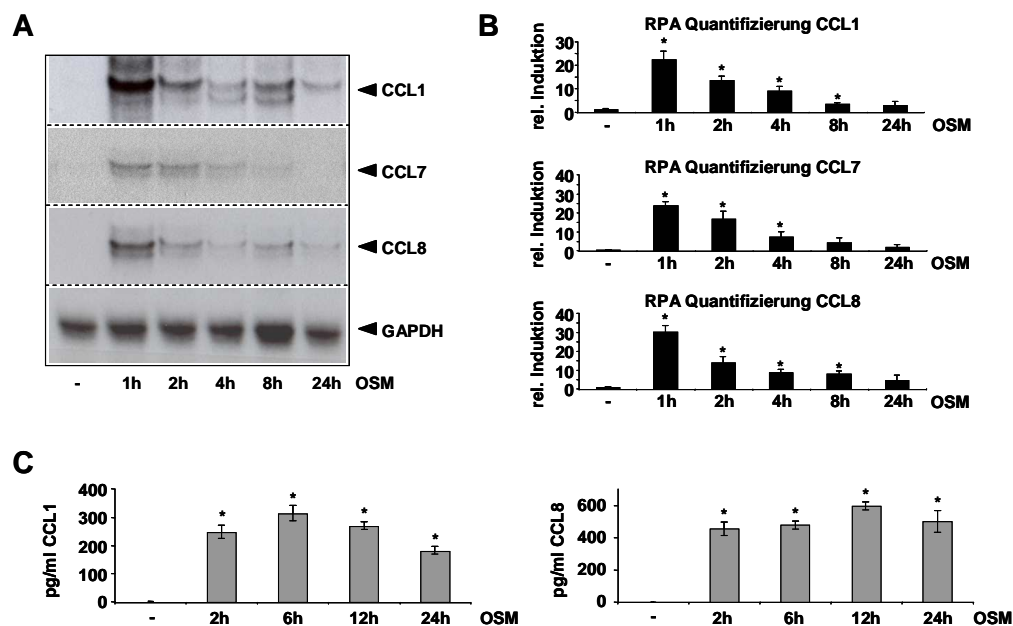


Abb.15: OSM induziert die Transkription von CCL1-, CCL7- und CCL8-mRNA

(A) Die mRNA-Spiegel von OSM-induziertem CCL1, CCL7 und CCL8 wurden mit Hilfe von *RNase Protection Assays* bestimmt. Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ist abgebildet. (B) Die Resultate der verschiedenen RPAs wurden mit Hilfe eines *Phosphoimager* quantifiziert, gegen die entsprechenden GAPDH-Werte normalisiert und als relative Induktion zum Wert der unstimulierten Proben aufgetragen. Werte \pm S.D. (n = 3). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert. (C) Die CCL1- und CCL8-Proteinmengen im Zellüberstand OSM-behandelter HDFs (20ng/ml) wurden mit Hilfe von ELISAs bestimmt. Werte \pm S.D. (n = 4). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert.

Einmal produzierte Chemokine sind dann für mindestens 12 h im Zellüberstand stabil. Darüberhinaus zeigt die Stimulation von HDFs mit ansteigenden Dosen OSM, dass eine verstärkte Transkription aller hier untersuchten Chemokine bereits bei 1ng/ml OSM beginnt und bei 10 - 20ng/ml ein Maximum erreicht (Abb.16A). Um zu evaluieren, ob auch andere inflammatorische Zytokine befähigt sind, die Chemokine CCL1, CCL7 und CCL8 in HDFs zu induzieren, wurden die Fibroblasten für 2 h mit 20ng/ml OSM, 100ng/ml LIF, 20ng/ml IL-6 (in Kombination mit 0,5 μ g sIL-6R), 10ng/ml TNF α oder 10ng/ml IL-1 β stimuliert. In gleichem Maße wie Oncostatin M beeinflussen sowohl TNF α , als auch IL-1 β die mRNA-Spiegel von CCL1, CCL7 und CCL8 (Abb.16B-D). Dennoch ist eine deutliche Verzögerung der Chemokinsekretion in mit TNF α - oder IL-1 β -stimulierten HDFs zu beobachten. Lediglich Oncostatin M ist befähigt, bereits nach einer Stunde ca. 60% der

maximalen Chemokinsekretion zu induzieren. Nach 24 h stimulieren noch alle drei Zytokine eine substantielle Sekretion der untersuchten Chemokine (Abb.17).

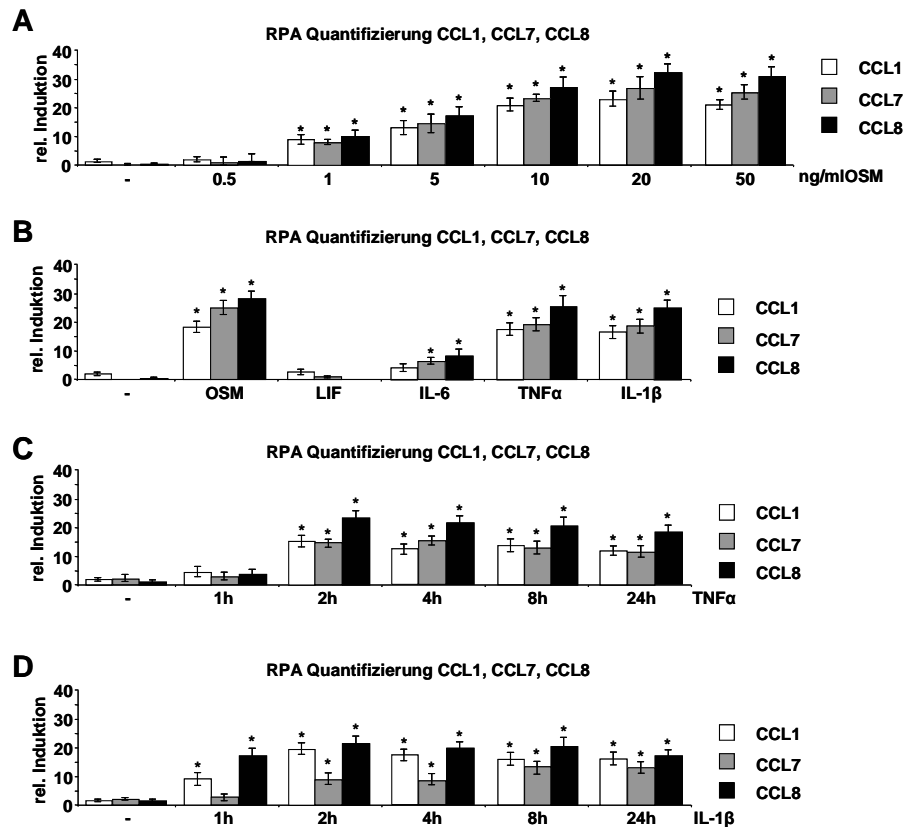


Abb.16: Andere IL-6-Typ Zytokine induzieren die Expression von CCL1, CCL7 und CCL8 nur marginal

(A) HDFs wurden 2 h mit ansteigenden Mengen OSM stimuliert. Die CCL1-, CCL7- und CCL8-mRNA-Spiegel wurden mit Hilfe von *RNase Protection Assays* (RPA) bestimmt. Die Resultate der verschiedenen RPAs wurden mit Hilfe eines *Phosphoimager* quantifiziert, gegen die entsprechenden GAPDH-Werte normalisiert und als relative Induktion zum Wert der unstimulierten Proben aufgetragen. Werte \pm S.D. ($n = 3$). * = $p < 0.05$ gegen den Kontrollwert. **(B)** HDFs wurden 2 h mit 20ng/ml OSM, 100ng/ml LIF, 20ng/ml IL-6 (+0,5 μ g/ml sIL-6R), 10ng/ml TNF α oder 10ng/ml IL-1 β stimuliert. Die CCL1-, CCL7- und CCL8-mRNA-Spiegel wurden erneut mit Hilfe von RPAs bestimmt und wie in (A) beschrieben ausgewertet. **(C)** und **(D)** HDFs wurden für die angezeigten Zeiträume mit 10ng/ml TNF α oder 10ng/ml IL-1 β stimuliert. Die Bestimmung der mRNA-Spiegel und deren Quantifizierung erfolgten wie in (A) beschrieben.

Im Gegensatz zu den proinflammatorischen Zytokinen führt die Stimulation mit IL-6 nur zu einem schwachen Anstieg von CCL7- bzw. CCL8-mRNA, die Stimulation mit LIF induziert überhaupt keine mRNAs der analysierten Chemokine (Abb.16B).

In Anbetracht der beschriebenen Experimente lässt sich festhalten, dass OSM die Chemokine CCL1, CCL7 und CCL8 in ähnlicher Weise wie TNF α oder IL-1 β induziert, wenngleich eine Stimulation mit Oncostatin M bereits zu deutlich früheren Zeitpunkten zu einer signifikanten Chemokinsekretion führt.

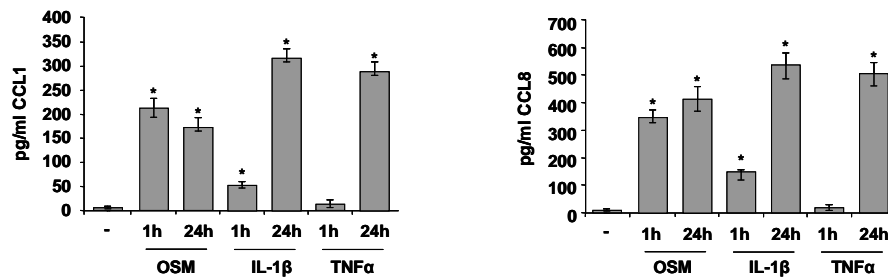


Abb.17: Die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β stimulieren die Sekretion von CCL1 und CCL8 im Vergleich zu OSM mit zeitlicher Verzögerung

HDFs wurden eine bzw. 24 h mit 20ng/ml OSM, 10ng/ml IL-1 β oder 10ng/ml TNF α stimuliert. Die CCL1- und CCL8-Proteinmengen wurden mit Hilfe von ELISAs bestimmt. Werte \pm S.D. (n = 3). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert.

III.2.2 Die OSM-induzierte Expression von CCL1 und CCL8 stimuliert die Migration von Leukozyten

Sowohl für CCL1, als auch für CCL8 wurde bereits beschrieben, dass sie an der Rekrutierung von Monozyten und T-Lymphozyten beteiligt sein können. Aus diesem Grund sollte im Folgenden die Frage beantwortet werden, ob die durch OSM induzierten Mengen CCL1 und CCL8 ausreichend sind, um die Migration von Leukozyten zu ermöglichen. HDFs wurden deshalb 3 h mit 20ng/ml OSM stimuliert. Der chemokinhaltige Zellüberstand wurde dann in eine modifizierte Boyden Kammer überführt. Weder eine direkte Behandlung mit OSM, noch der Zellüberstand von unbehandelten HDFs beeinflussen das Migrationsverhalten der primären Leukozyten (Abb.18A und B; Säulen 2 und 3). Im Gegensatz dazu induziert der Überstand von OSM-stimulierten HDFs die Migration von ungefähr 50% der eingesetzten Monozyten bzw. T-Lymphozyten vom oberen ins untere Reservoir der *transwells* (Abb.18A und B; Säule 4). Um die partielle Beteiligung der einzelnen Chemokine an der Gesamtmigration genauer zu evaluieren, wurden neutralisierende Antikörper gegen CCL1 und CCL8 eingesetzt. Wie erwartet

reduziert die Neutralisierung von CCL1 die Migration von Monozyten (Abb.18A; Säule 6) und T-Lymphozyten (Abb.18B; Säule 6), während die Blockade von CCL8 die Migration von Monozyten signifikant hemmt (Abb.18A; Säule 7), aber nur einen geringen inhibitorischen Effekt auf die Migration von T-Lymphozyten hat (Abb.18B; Säule 7). Beim gleichzeitigen Einsatz beider Antikörper lassen sich keine additiven Effekte nachweisen (Abb.18A und B; Säule 8).

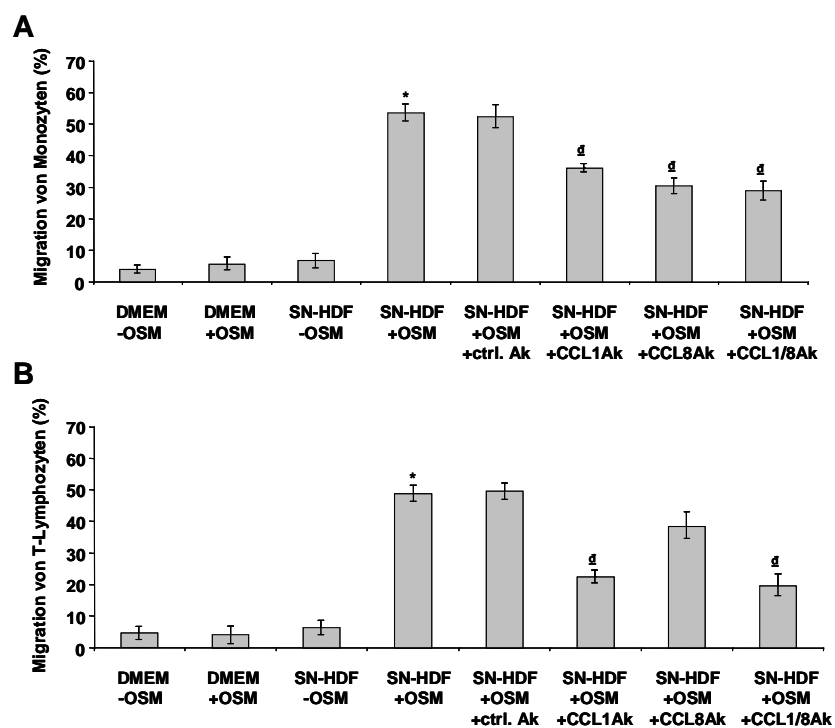


Abb.18: Eine OSM-induzierte CCL1- und CCL8-Expression vermittelt die Migration von primären Monozyten und T-Lymphozyten

(A) und (B) Mit Hilfe von Zellüberständen OSM-behandelter HDFs (20ng/ml, 3 h) wurde das Potential sezernierter Chemokine analysiert, die Migration von primären Leukozyten in einer modifizierten Boyden Kammer zu induzieren. Die Anzahl migrierter Monozyten und T-Lymphozyten wurde bestimmt und mit den entsprechenden Kontrollansätzen verglichen. Werte \pm S.D. (n = 3). * = $p < 0.05$ gegen den Kontrollwert; [‡] = $p < 0.05$ gegen den Antikörper-Kontrollwert.

Die in humanen, dermalen Fibroblasten durch OSM-induzierte Sekretion diverser Chemokine führt also zur Migration von Leukozyten, die partiell auch durch die beiden Chemokine CCL1 und CCL8 vermittelt wird.

III.2.3 Während ERK1/2 die Transkription von Chemokinen beeinflusst, stabilisiert p38 die Chemokin-mRNA durch einen TTP-inhibierenden Mechanismus

Im Weiteren sollten die Signaltransduktionswege untersucht werden, über die Oncostatin M die Transkription von CCL1, CCL7 und CCL8 induziert. Dazu wurden unter anderem etablierte, pharmakologische Inhibitoren der drei MAPK-Familien ERK, p38 und JNK genutzt, um mit ihrer Hilfe die Bedeutung der einzelnen Kinasen für die OSM-vermittelte Induktion von CCL1, CCL7 und CCL8 zu analysieren.

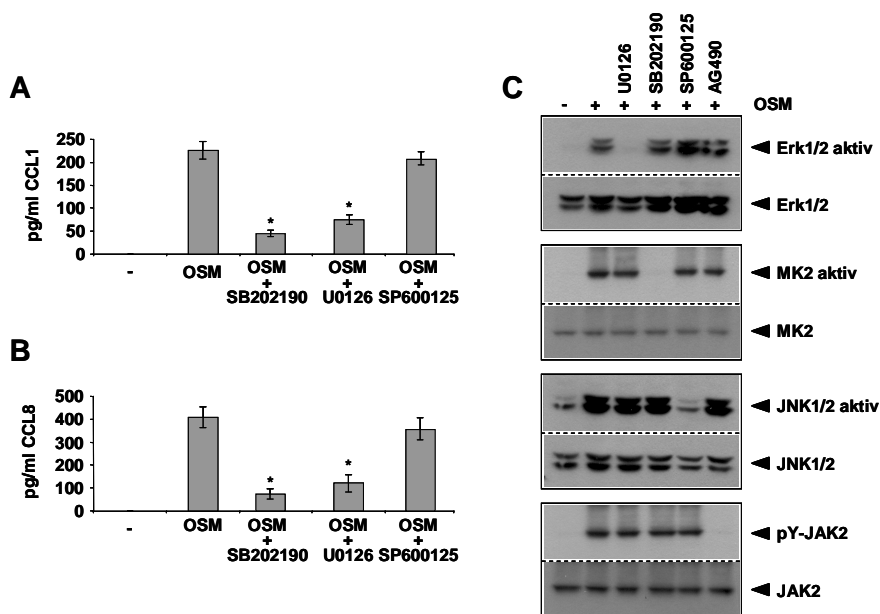


Abb.19: ERK1/2 und p38, nicht aber JNK1/2 sind an der OSM-vermittelten Induktion von CCL1 und CCL8 beteiligt

(A) und (B) HDFs wurden mit 10 μ M SB202190, 10 μ M U0126 und 10 μ M SP600125 für 30 min vorinkubiert, um dann 3 h mit 20ng/ml OSM stimuliert zu werden. Die sezernierten Mengen CCL1 und CCL8 wurden dann mit ELISAs bestimmt. Werte \pm S.D. (n = 5). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert. (C) HDFs wurden wie in (A) und (B) beschrieben stimuliert und in einem zusätzlichen Ansatz mit 10 μ M AG490 präinkubiert. Die angefertigten Lysate wurden dann mit Hilfe eines Western Blots aufgearbeitet und die erhaltenen Membranen mit phosphospezifischen Antikörpern gegen ERK1/2, MK2, JNK1/2 und JAK2 gefärbt. Anschließend wurden die Blots gestrippt und mit Antikörpern detektiert, die die entsprechenden Proteine unabhängig von ihrem Phosphorylierungsstatus erkennen.

Eine Präinkubation von HDFs mit dem p38 MAPK Inhibitor SB202190 oder dem ERK1/2 Inhibitor U0126 und einer anschließenden dreistündigen OSM-Stimulation führt zu einer signifikanten Reduktion des CCL1- und CCL8-Proteingehalts in HDF-Zellüberständen. Der Einsatz des JNK Inhibitor SP600125 hat dagegen keine Auswirkungen auf die induzierten Chemokinspiegel (Abb.19A und B). Eine entsprechende RPA-Analyse der mRNA-Spiegel der untersuchten Chemokine steht im Einklang mit den hier dargestellten Ergebnissen (Daten nicht gezeigt). Die Immundetektion in Abbildung 19C veranschaulicht den Wirkungsgrad der eingesetzten Inhibitoren, die die Aktivierung von Zielgenen der von ihnen gehemmten Kinasen verhindern.

Um herauszufinden ob ERK1/2 und p38 die direkte Initiation der Chemokin-Transkription oder die Stabilisierung von Chemokin-mRNA beeinflussen, wurde die zeitabhängige Abnahme von CCL1-, CCL7- und CCL8-mRNA in An- oder Abwesenheit von OSM und den entsprechenden pharmakologischen Inhibitoren SB202190 und U0126 verglichen (Abb.20A, B und Daten nicht gezeigt).

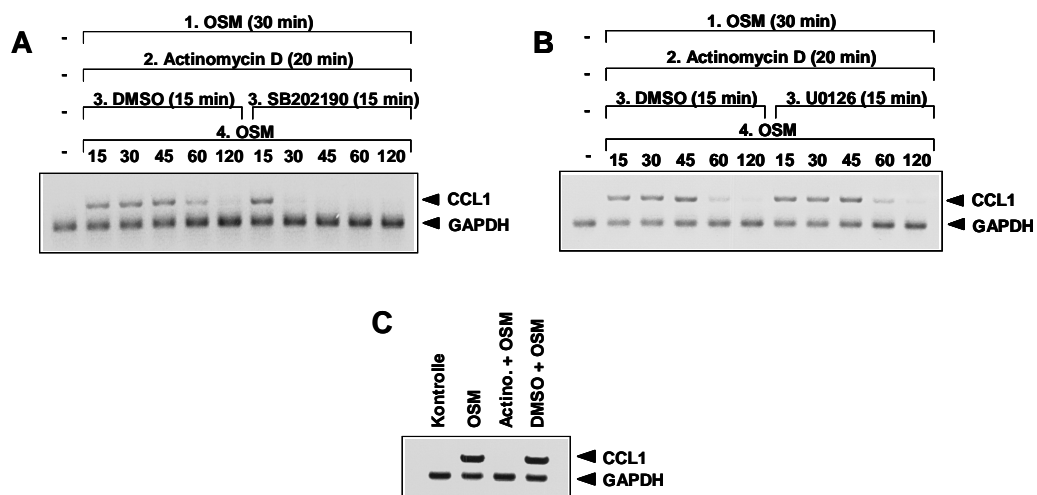


Abb.20: Die OSM-induzierte Aktivierung von p38 beeinflusst die CCL1-mRNA-Stabilität

(A), (B) und (C) HDFs wurden 30 min mit 20ng/ml OSM stimuliert. Daraufhin wurden die Zellen gewaschen und zusätzlich weitere 20 min in OSM-freiem Medium mit Actinomycin D (4 μ M) inkubiert, um eine fortlaufende Transkription zu blocken. Danach wurden 10 μ M SB202190 oder 10 μ M U0126 hinzugegeben bevor eine abschließende, zweite Stimulation mit OSM für die angegebenen Zeiträume erfolgte. CCL1 und GAPDH mRNA-Spiegel wurden mit Hilfe von RT-PCRs ermittelt.

Die Chemokinexpression in HDFs wurde zunächst durch eine 30minütige Stimulation mit OSM induziert. Anschließend wurde der OSM-haltige Zellüberstand entfernt und Actinomycin D zum Medium gegeben, um eine fortlaufende mRNA-Synthese zu unterbrechen. Nach 20minütiger Inkubation mit Actinomycin D konnte nach erfolgter Präinkubation mit SB202190 und U0126 erneut mit OSM stimuliert werden, um in An- oder Abwesenheit der MAPK Inhibitoren die OSM-abhängige Signalkaskade zu aktivieren. Die nach 30minütiger OSM-Stimulation induzierte CCL1-mRNA wird nach einer weiteren OSM-Inkubation erst 60 min später degradiert. Die Anwesenheit des p38 Inhibitors SB202190 im Zellüberstand verhindert dagegen eine Stabilisierung der mRNA-Spiegel und führt bereits nach 15 zusätzlichen Minuten OSM-Stimulation zur Degradation der Chemokin-mRNA (Abb.20A). Im Gegensatz dazu hat der MEK1 Inhibitor U0126 keine destabilisierende Wirkung auf die CCL1-mRNA. Vergleichbare Ergebnisse liefern Experimente zur Untersuchung von CCL7- und CCL8-mRNA Stabilität (Daten nicht gezeigt). Das zusätzliche Kontrollexperiment zeigt, dass Oncostatin M in der Gegenwart von Actinomycin D keine Transkription von Chemokinen induzieren kann (Abb.20C).

Es ist bekannt, dass die Stabilisierung AU-reicher mRNAs durch eine p38 MAPK-abhängige Phosphorylierung vermittelt werden kann, die zur Degradation des mRNA-destabilisierenden Proteins Tristetraprolin (TTP) führt. Ein vergleichbarer Mechanismus könnte auch für OSM-aktiviertes p38 von Bedeutung sein. Dem zur Folge müsste ein *knock-down* von TTP unabhängig vom Einsatz des p38 Inhibitors SB202190 zur Stabilisierung der Chemokin-mRNA beitragen.

Wie erwartet zeigt Abbildung 21A dieses Ergebnis. Die mRNA-Spiegel von CCL1, CCL7 und CCL8 weisen in TTP-*knock-down*-Zellen eine inhibitorunabhängige, verlängerte Halblebenszeit auf. Im Einklang damit stehen die Ergebnisse, die in Abbildung 21B und 21C dargestellt sind. Die SB202190-vermittelte Reduktion von OSM-induziertem CCL1 und CCL8 ist in TTP-*knock-down*-Zellen komplett aufgehoben (Abb.21B und C; Säulen 6 und 9).

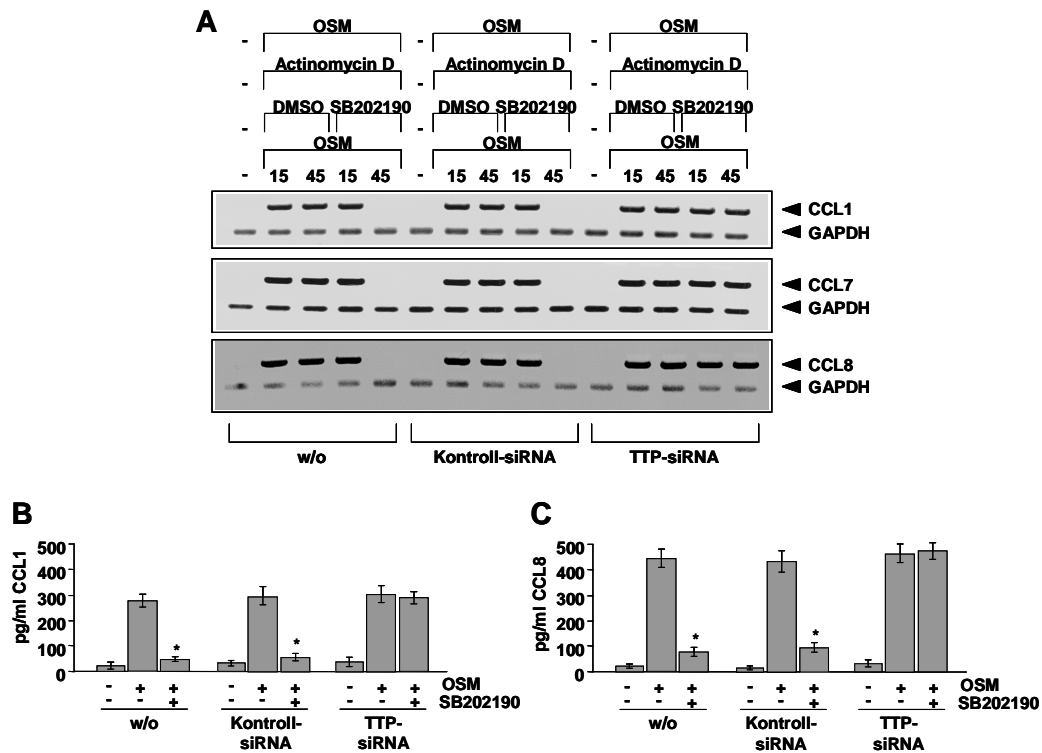


Abb.21: p38 stabilisiert OSM-induzierte Chemokin-mRNA über einen TTP-degradierenden Mechanismus

(A) HDFs wurden, wie im Material und Methoden Abschnitt beschrieben, mit TTP-siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen nach einer anfänglichen Stimulation mit OSM (30 min), 20 min in OSM-freiem Medium mit 4µM Actinomycin D und dann 20 min mit 10µM SB202190 vorbehandelt. Abschließend erfolgte eine zweite Stimulation mit OSM für die angegebenen Zeiträume. CCL1, CCL7, CCL8 und GAPDH mRNA-Spiegel wurden mit Hilfe einer RT-PCR analysiert. (B) und (C) HDFs wurden erneut mit TTP-siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen 20 min mit 10µM SB202190 vorbehandelt, um dann 3 h mit 20ng/ml OSM stimuliert zu werden. Die CCL1- und CCL8-Proteinmengen in den Zellüberständen wurden mit Hilfe von ELISAs bestimmt. Werte \pm S.D. (n = 3). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert.

Da die Inhibierung von ERK1/2 keinen Einfluss auf die Stabilität der Chemokin-mRNAs zeigt, sollte im Weiteren ein möglicher, direkter Einfluss von ERK1/2 auf die Transkription der Chemokine analysiert werden. Der *knock-down* der zwei direkten ERK1/2-Zielgene c-Jun und c-Fos sollte darüber Aufschluss geben (Abb.22C).

Die Abbildungen 22A und 22B verdeutlichen, dass ein Fehlen von c-Jun und c-Fos zu einer starken Reduktion von OSM-induziertem CCL1 und CCL8 führt.

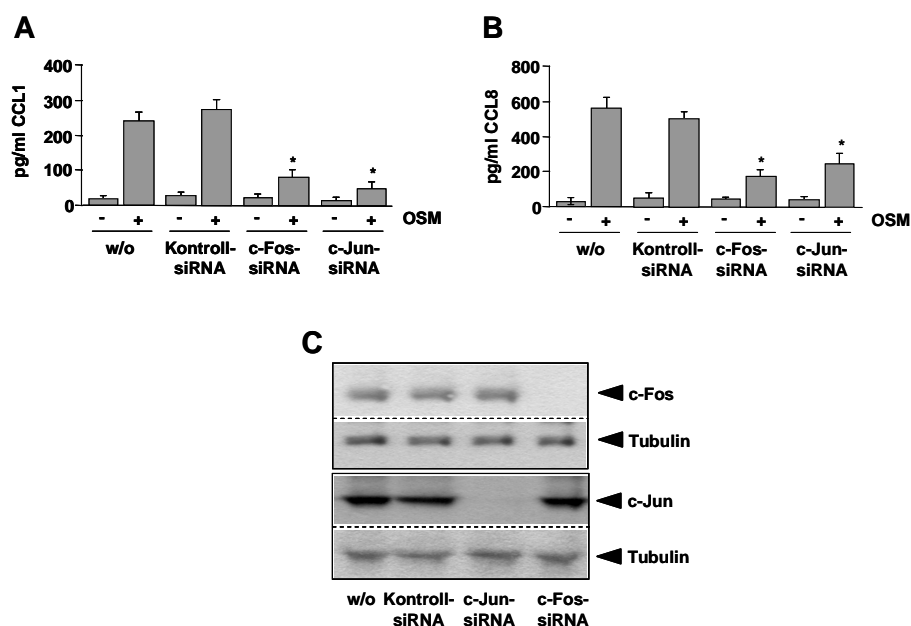


Abb.22: Die OSM-abhängige Expression von CCL1 und CCL8 wird über den ERK1/2-AP1-Signalweg induziert

(A) und (B) HDFs wurden mit c-Jun und c-Fos siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden im Zellüberstand die CCL1- und CCL8-Proteinmengen mit Hilfe von ELISAs gemessen. Werte \pm S.D. (n = 4). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert. (C) Um die Effizienz des entsprechenden siRNA-*knock-downs* zu bestätigen, wurden die Zellen lysiert und die Proteine nach der Durchführung eines Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen c-Jun und c-Fos detektiert. Tubulin diente dabei als Ladekontrolle.

III.2.4 Die OSM-vermittelte Expression von CCL1 wird durch STAT5 negativ reguliert

Im weiteren Verlauf der Arbeit stellte sich nun die Frage, ob auch der durch OSM aktivierte JAK/STAT-Signalweg eine Bedeutung für die induzierte Expression von CCL1 und CCL8 haben könnte. Aus diesem Grund wurden HDFs mit spezifischen siRNAs gegen STAT1, STAT3 und STAT5 transfiziert. Obwohl die Analyse der Gesamtzelllysate einen kompletten *knock-down* der aktivierten STAT-Faktoren verdeutlicht (Abb.23A), beeinflusst weder die Abwesenheit von aktiviertem STAT1, noch die von phosphoryliertem STAT3 die Expression der Chemokine CCL1 und CCL8 (Abb.23B). Ein *knock-down* von STAT5 dagegen bewirkt eine ansteigende CCL1-Sekretion (Abb.23B; oberes Säulendiagramm). Studien im ersten Teil dieser Arbeit zeigen bereits, dass STAT5 direkt über JAK2 aktiviert werden kann

(144,145). Um diese Ergebnisse nachhaltig zu verifizieren, wurden HDFs mit AG490, einem Inhibitor, der eine höhere Affinität für JAK2 als für die übrigen Janus Kinasen aufweist, vorbehandelt. Wie vermutet, bewirkt der Einsatz des AG490 Inhibitors eine gesteigerte CCL1-Expression (Abb.23C; linkes Säulendiagramm), während er keinen Einfluss auf die OSM-induzierte CCL8-Expression hat (Abb.23C; rechtes Säulendiagramm).

Das murine Homolog zum humanen CCL1 ist bereits vor einigen Jahren als TCA-3 beschrieben worden.

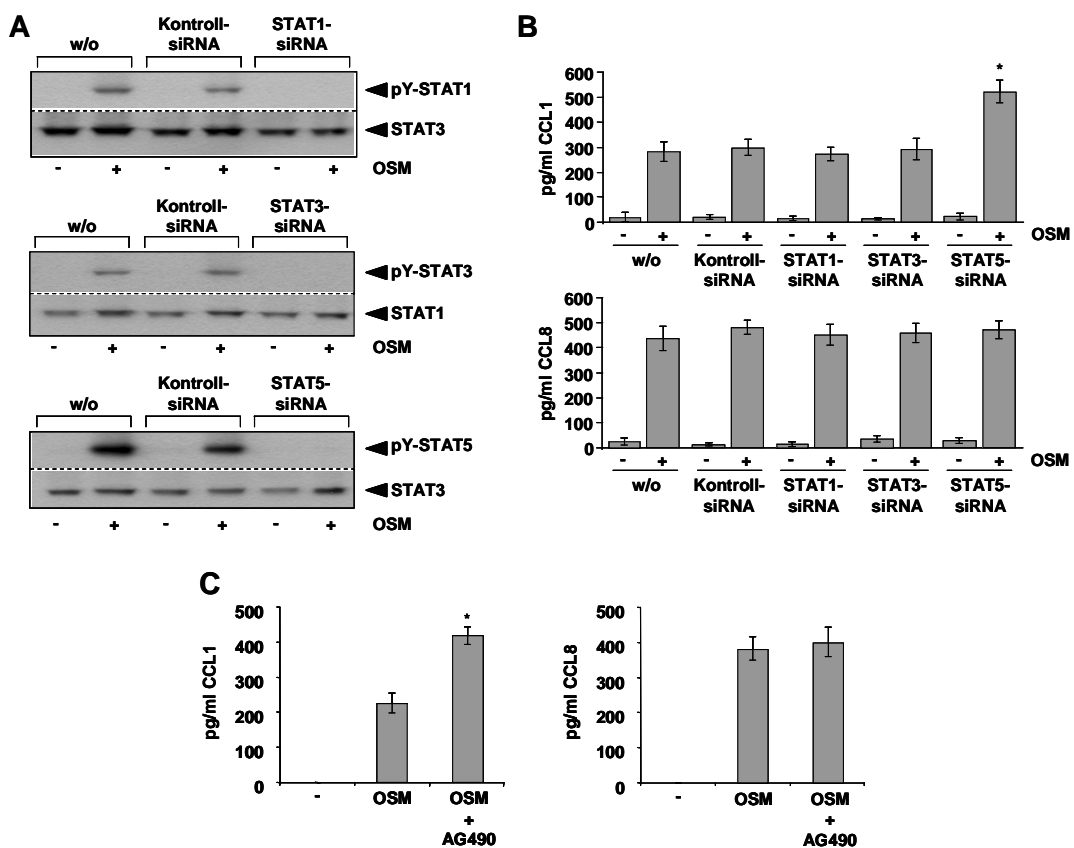


Abb.23: Die Expression von CCL1 wird durch STAT5 negativ beeinflusst

(A) Die Gesamtzelllysate von siRNA-transfizierten (STAT1, STAT3 und STAT5) HDFs (20ng/ml; 3 h) wurden über einen Western Blot aufgearbeitet und die Proteine mit spezifischen Antisern gegen die phosphorylierten und unphosphorylierten Formen von STAT1, STAT3 und STAT5 detektiert. (B) Die CCL1- und CCL8-Proteinmengen in den Zellüberständen der in (A) transfizierten Zellen wurden mit ELISAs bestimmt. Werte \pm S.D. (n = 5). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert. (C) HDFs wurden 30 min mit 10 μ M AG490 vorbehandelt und dann 3 h mit OSM (20ng/ml) stimuliert. Die CCL1- und CCL8-Proteinmengen im Zellüberstand wurden mit einem ELISA ermittelt. Werte \pm S.D. (n = 4). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert.

Aus diesem Grund sollten im Folgenden mRNA- und Proteinspiegel von TCA-3 nach OSM-Stimulation in Wildtyp- und STAT5^{-/-}-MEFs analysiert werden. In den Wildtyp-MEFs ist eine deutliche, transiente Induktion von TCA-3-mRNA detektierbar (Abb.24A), die in den STAT5-*knock-out*-Zellen signifikant verlängert und somit auch nach 24 h noch nachweisbar ist (Abb.24B). Die deutlich verlängerte TCA-3-Transkription in STAT5^{-/-}-MEFs spiegelt sich auch in einem, vor allem zu späteren Zeitpunkten erhöhten TCA-3-Proteinspiegel im Zellüberstand wider (Abb.24C).

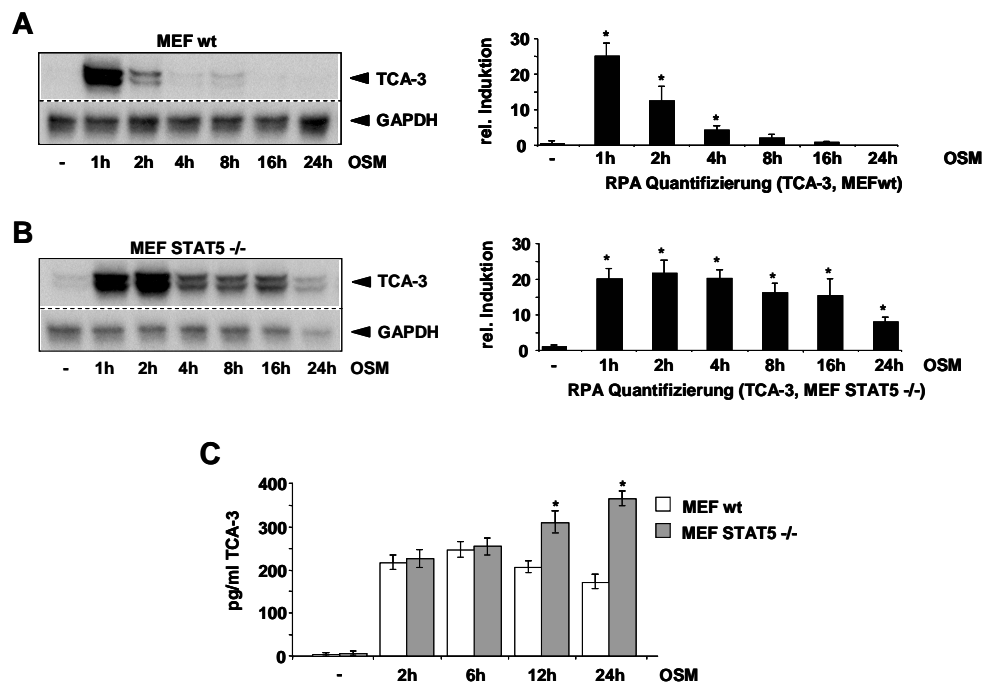


Abb.24: TCA-3, das murine Homolog zu CCL1, wird ebenfalls negativ durch STAT5 reguliert (A) und (B) MEF-Zellen wurden mit 20ng/ml murinem OSM für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Die TCA-3-mRNA-Spiegel wurden mit Hilfe von RPAs analysiert. Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ist abgebildet. Die Resultate der verschiedenen RPAs wurden mit Hilfe eines *Phosphoimager* quantifiziert, gegen die entsprechenden GAPDH-Werte normalisiert und als relative Induktion zum Wert der unstimulierten Proben aufgetragen. Werte \pm S.D. (n = 3). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert. (C) Wildtyp- und STAT5^{-/-}-MEFs wurden für die angegebenen Zeiträume mit murinem OSM stimuliert. Mit Hilfe eines ELISAs wurden die entsprechenden TCA-3-Proteinspiegel im Zellüberstand nachgewiesen. Werte \pm S.D. (n = 3). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert.

Um im Weiteren herauszufinden, ob STAT5 selbst, STAT5-induzierbare Proteine oder *downstream*-Faktoren für die negative TCA-3-Regulation in Wildtyp-MEFs verantwortlich sind, wurde das Aktivierungsprofil prominenter Vertreter aus OSM-

induzierten Signalwegen untersucht (Abb.25A). Es lassen sich sehr vergleichbare Phosphorylierungskinetiken von STAT1, STAT3, ERK1/2 und p38 für die analysierten Zeiträume zwischen Wildtyp- und STAT5-*knock-out*-MEFs erkennen. Wie erwartet lässt sich in STAT5^{-/-}-MEFs keine STAT5-Aktivierung nachweisen (Abb.25A; dritter Blot). Die nähere Betrachtung der für die Signaltransduktion von IL-6-Typ Zytokinen bekannten *feedback*-Inhibitoren SOCS1 und SOCS3 zeigt ebenfalls keine Unterschiede. Beide Proteine sind in den untersuchten Zelltypen induzierbar. Im Gegensatz dazu ist die Induktion des STAT5-abhängigen *feedback*-Inhibitors CIS in STAT5-defizienten Zellen erwartungsgemäß nicht zu beobachten (Abb.25B; dritter Blot).

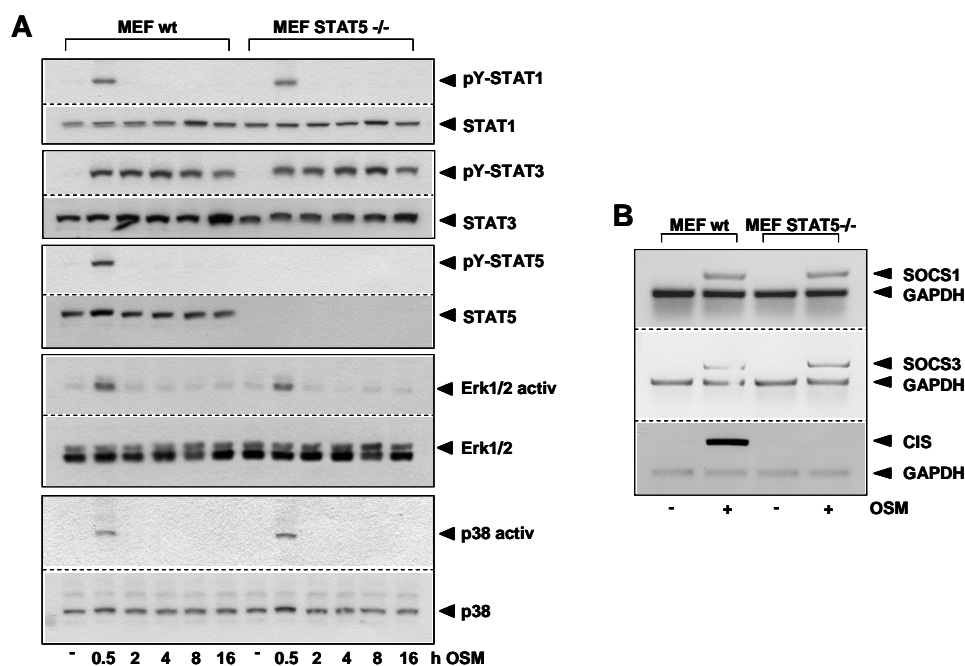


Abb.25: Vergleich von Aktivierungsprofilen prominenter Vertreter aus dem OSM-Signaltransduktionsweg

(A) Wildtyp- und STAT5-defiziente MEFs wurden für die angegebenen Zeiträume mit murinem OSM (20ng/ml) stimuliert. Gewonnene Gesamtzelllysate wurden über Western Blots aufgearbeitet und die entsprechenden Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen die phosphorylierten und nicht phosphorylierten Formen von STAT1, STAT3, STAT5, ERK1/2 und p38 detektiert. **(B)** MEF-Zellen wurden 1 h mit murinem OSM (20ng/ml) stimuliert. Nach erfolgter RNA-Extraktion wurden die SOCS1-, SOCS3- und CIS-mRNA-Spiegel mit Hilfe entsprechender RT-PCRs analysiert.

Auf diesen Ergebnissen basierend sollten die folgenden Experimente die Bedeutung von CIS für die OSM-vermittelte CCL-1-Expression näher beleuchten.

So wurden HDFs erfolgreich mit CIS-siRNA transfiziert und anschließend mit OSM stimuliert (Abb.26A).

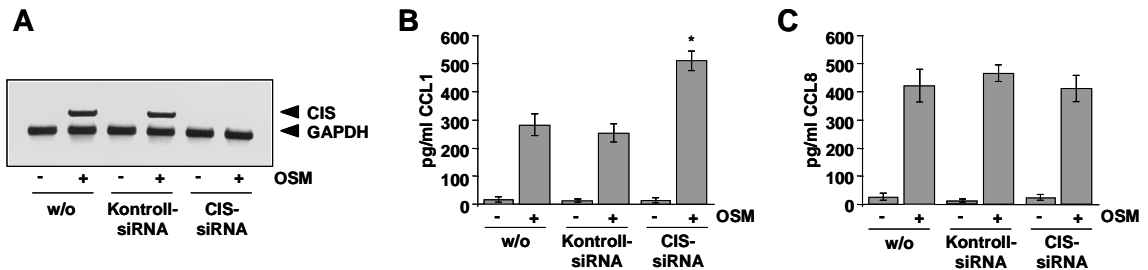


Abb.26: Die Negativregulation von CCL1 wird über STAT5-induziertes CIS vermittelt

(A) HDFs wurden mit CIS-siRNA transfiziert und 48 h nach der Transfektion mit 20ng/ml OSM stimuliert. CIS- und GAPDH-mRNA-Spiegel wurden mit Hilfe einer entsprechenden RT-PCR detektiert. (B) und (C) HDFs wurden wie in (A) beschrieben transfiziert. Die CCL1- und CCL8-Proteinmengen im Zellüberstand wurden mit ELISAs ermittelt. Werte \pm S.D. (n = 4). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert.

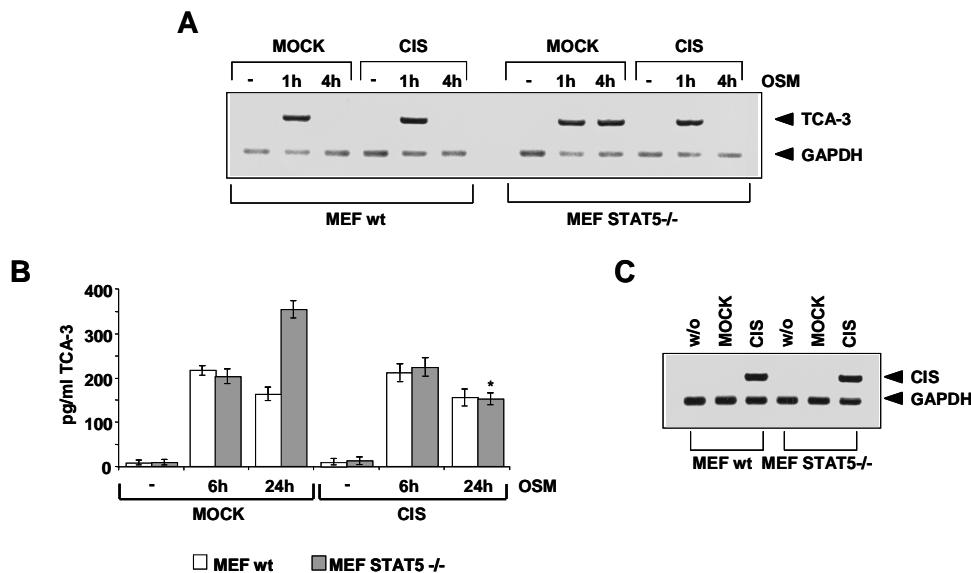


Abb.27: Überexprimiertes CIS reduziert die erhöhten CCL1-Spiegel in STAT5-defizienten MEFs

(A) und (C) MEFs wurden transient mit einem Expressionsvektor für murines CIS bzw. einem Kontrollvektor transfiziert und 1 oder 4 h mit 20ng/ml OSM stimuliert. TCA-3 und CIS wurden nach erfolgter RNA-Extraktion in einer RT-PCR nachgewiesen. (B) MEFs wurden wie zuvor beschrieben transfiziert. Im Zellüberstand wurden dann mittels ELISA die sezernierten CCL1-Mengen gemessen. Werte \pm S.D. (n = 3). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert.

Abbildung 26B verdeutlicht, dass die sezernierte Proteinmenge von CCL1 in den mit CIS-siRNA transfizierten HDFs signifikant erhöht ist. Die Menge an sezerniertem CCL8 bleibt dagegen vom CIS-*knock-down* unbeeinflusst (Abb.26C). Die erhöhten CCL1-Spiegel in STAT5-defizienten Zellen lassen sich also dadurch erklären, dass OSM in diesen Zellen nicht mehr befähigt ist, CIS zu induzieren. Dementsprechend reduziert die Überexpression von CIS die erhöhten TCA-3-mRNA- und Proteinspiegel in STAT5-defizienten MEFs auf Wildtypniveau (Abb.27).

Die IL-1 β - und TNF α -vermittelte CCL1-Expression wird weder durch einen STAT5, noch durch einen CIS-*knock-down* in dermalen Fibroblasten beeinflusst (Abb.28).

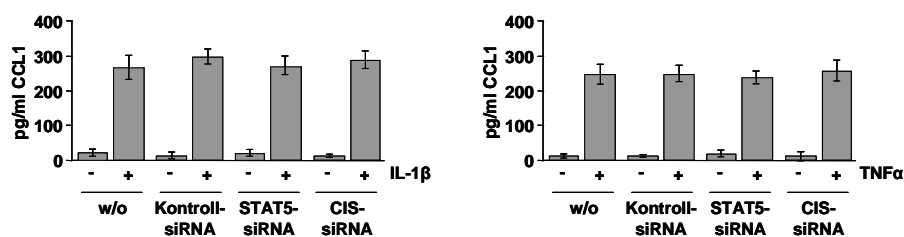


Abb.28: Weder die IL-1 β -, noch die TNF α -vermittelte CCL1-Expression werden durch einen STAT5- oder CIS-*knock-down* beeinflusst.

HDFs wurden mit STAT5- bzw. CIS-siRNA transfiziert und dann 3 h mit 10ng/ml IL-1 β oder TNF α stimuliert. Die CCL1-Proteinmengen im Zellüberstand wurden mittels ELISA bestimmt. Werte \pm S.D. (n = 3). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert.

III.2.5 Eine konstitutive Aktivierung des JAK2/STAT5-Signalwegs in Zellen akuter myeloider Leukämie unterdrückt die CCL1-Expression

STAT Transkriptionsfaktoren sind dafür bekannt, dass sie in einer Reihe von Tumorzellen konstitutiv aktiviert sind. Dies trifft vor allem auf STAT3 und STAT5 zu. Erst vor kurzem wurde eine Mutation im humanen JAK2-Gen in Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen identifiziert (146). Diese Mutation in der Pseudokinasedomäne von JAK2 (V₆₁₇F) bewirkt eine konstitutive Aktivierung dieser Janus Kinase und folglich auch eine Aktivierung von STAT5 und ERK1/2 (Abb.29A). Da die im Vorangegangenen beschriebenen Ergebnisse eine negativ-

regulatorische Funktion des STAT5/CIS-Signalwegs auf die Expression von CCL1 nahelegen, sollte im Weiteren untersucht werden, ob Zellen von Patienten mit akuter myeloider Leukämie (HEL-Zellen) aufgrund der vorhandenen JAK2 (V_{617F})-Mutation die CCL1-Expression konstitutiv unterdrücken. Da HEL-Zellen tatsächlich auch dauerhaft CIS exprimieren (Abb.29B; Spur 1), können sie, im Gegensatz zu Monozyten von gesunden Spendern, nach einer IL-1 β - oder OSM-Stimulation kein CCL1 sezernieren (Abb.29C; Säule 4 und Abb.29D; Säulen 2 und 3).

Um die konstitutive JAK2-Aktivierung in HEL-Zellen zu reduzieren, wurden die Zellen 12 h mit einem für alle Janus Kinasen spezifischen Inhibitor (JAK Inhibitor 1) inkubiert. Nach der Behandlung sind die aktivierten Formen von JAK2, STAT5 und ERK1/2 wie beabsichtigt nicht mehr nachweisbar (Abb.29A; Spur 3). Darüberhinaus wird erwartungsgemäß auch die konstitutive Expression von CIS unterbunden (Abb.29B; Spur 2). Da OSM selbst zur Aktivierung seiner eigenen Signalkaskade von der Aktivierung von JAK1 und JAK2 abhängig ist, verhindert die Behandlung der HEL-Zellen mit dem JAK Inhibitor 1 (JI-1) auch eine mögliche OSM-vermittelte Signaltransduktion. Aus diesem Grund kann OSM, gewöhnlicherweise ein starker CIS-Induktor, in diesem Fall weder eine CIS- (Abb.29B; Spur 4) noch eine CCL1-Expression initiieren (Abb.29E; Säule 3). Im Gegensatz dazu ist IL-1 β , das über IRAK und IKK signalisiert, unabhängig von Janus Kinasen und kann auch in Gegenwart des JI-1 signalisieren. Interessanterweise ist IL-1 β befähigt, in Abwesenheit des konstitutiv aktiven JAK2/STAT5/CIS-Signalwegs in HEL-Zellen eine starke CCL1-Expression zu induzieren (Abb.29E; Säule 2). Um den direkten Einfluss von CIS auf die Unterdrückung der CCL1-Expression in HEL-Zellen zu untersuchen, wurden diese mit CIS-siRNA transfiziert (Abb.29D; unterer Blot). Der alleinige *knock-down* von CIS resultiert in einer konstitutiven Expression von CCL1 (Abb.29D; Säule 7). Da bereits zuvor beschriebene Resultate die Wichtigkeit von c-Jun und c-Fos als positive Regulatoren einer CCL1-Expression belegen (Abb.22), begründet die konstitutive Aktivierung von ERK1/2 die in diesem Fall dauerhafte Sekretion von CCL1 in HEL-Zellen. Die gerade beschriebene, konstitutive CCL1-Expression kann leicht durch eine zusätzliche OSM-, nicht aber durch eine IL-1 β -Stimulation gesteigert werden (Abb.29D; Säulen 8 und 9).

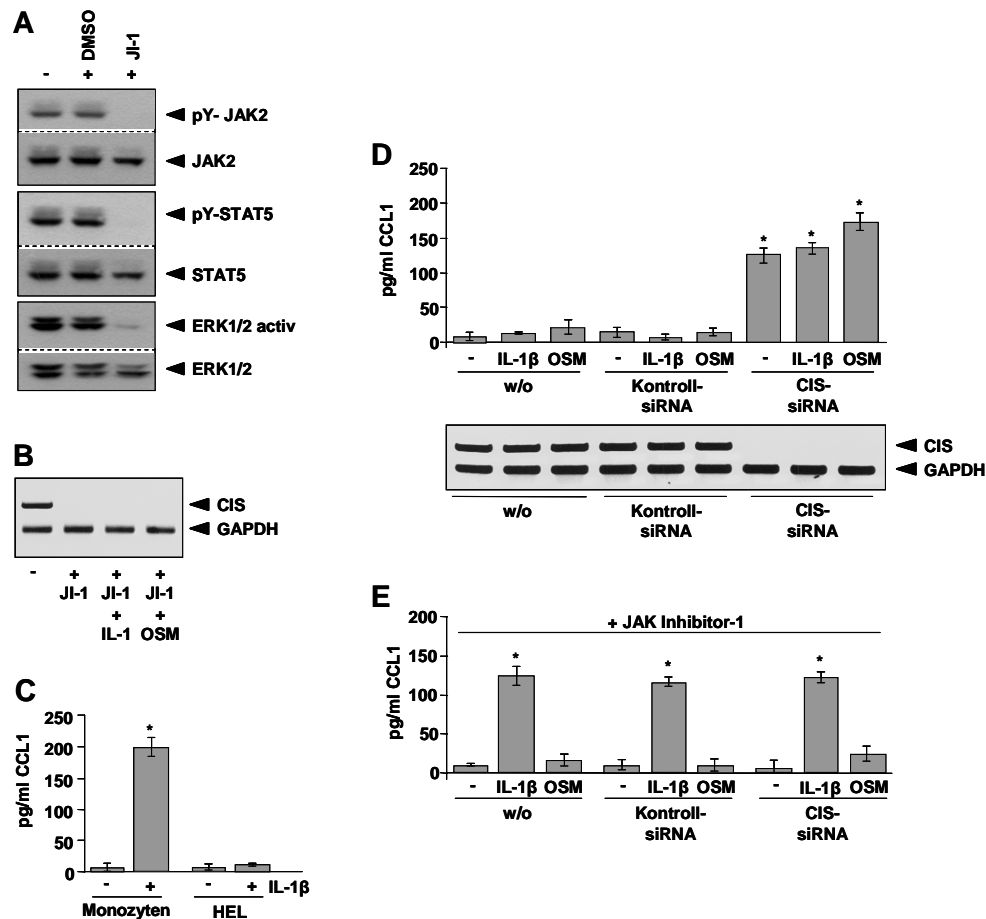


Abb.29: Unterdrückung der CCL1-Expression infolge der JAK2(V₆₁₇F)-Mutation

(A) HEL-Zellen wurden 12 h mit DMSO oder mit 1 μ M JAK Inhibitor 1 (JI-1) inkubiert. Die präparierten Lysate wurden dann über einen Western Blot aufgearbeitet und JAK2, STAT5 und ERK1/2 mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert. (B) HELs wurden erneut 12 h mit 1 μ M JAK Inhibitor 1 (JI-1) behandelt und dann 1 h mit 10ng/ml IL-1 β bzw. OSM stimuliert. Anschließend wurde RNA extrahiert und CIS mittels RT-PCR nachgewiesen. (C) Primäre Monozyten und HEL-Zellen wurden 3 h mit IL-1 β inkubiert. Die CCL1-Proteinmengen im Zellüberstand wurden mit Hilfe eines ELISAs ermittelt. Werte \pm S.D. (n = 4). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert. (D) HELs wurden mit Kontroll- oder CIS-siRNA transfiziert und dann 3 h mit 10ng/ml IL-1 β oder 20ng/ml OSM stimuliert. Die sezernierten CCL1-Proteinmengen im Zellüberstand wurden mit einem ELISA bestimmt. Werte \pm S.D. (n = 3). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert. Um die Effizienz des *knock-downs* zu analysieren, wurden die CIS-mRNA-Spiegel über eine RT-PCR ermittelt. (E) HELs wurden mit Kontroll- oder CIS-siRNA transfiziert, 12 h mit 1 μ M JAK Inhibitor 1 inkubiert und dann 3 h mit 10ng/ml IL-1 β oder 20 ng/ml OSM stimuliert. CCL1-Proteinmengen im Zellüberstand wurden mit Hilfe eines ELISAs gemessen. Werte \pm S.D. (n = 3). * = p < 0.05 gegen Kontrollwert.

Da IL-1 β selbst keine CIS-Expression induziert, hat ein zusätzlicher *knock-down* in JI-1-behandelten HEL-Zellen keinen weiteren stimulatorischen Effekt auf die IL-1 β -induzierte CCL1-Expression (Abb.29E; Säule 8). Dennoch bleibt nachdrücklich

festzuhalten, dass die durch die JAK2-Mutation V₆₁₇F induzierte konstitutive Expression von CIS die IL-1 β -induzierte CCL1-Expression in HELs in *trans* hemmen kann.

III.3 Die Bedeutung von OSM-induziertem CCL13 in der rheumatoiden Arthritis

Die rheumatoide Arthritis ist eine Autoimmunerkrankung, die durch eine lokal stark erhöhte und andauernde Zytokinproduktion vor allem der proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor α (TNF α), IL-1 sowie der IL-6-Typ Zytokine IL-6 und OSM charakterisiert ist. Obwohl sich die Antagonisierung von TNF α und IL-1 durch humanisierte monoklonale Antikörper oder lösliche Rezeptorfusionsproteine als großer Fortschritt in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis herausgestellt hat, reagiert ein signifikanter Anteil der Patienten nicht auf diese Behandlung. Daher ist eine nähere Untersuchung der Rolle der IL-6-Typ Zytokine sehr wichtig. Mit Hilfe von *RNase Protection Assays* konnten in der Vergangenheit institutsintern für die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis potentiell wichtige Kandidaten identifiziert werden. Dazu gehört auch das *monocyte chemoattractant protein* MCP-4 (CCL13), auf dessen extrem hohe Expression in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis eine kürzlich erschienene Publikation hinweist (147). Die zugrundeliegenden Signaltransduktionsmechanismen der OSM-induzierten Expression von CCL13 und die Bedeutung dieses Chemokins für den Verlauf einer rheumatoiden Arthritis sollten im dritten Teil dieser Arbeit untersucht werden.

III.3.1 Ausschließlich synoviale Fibroblasten sind durch eine OSM-induzierte CCL13-Expression charakterisiert

Um die OSM-vermittelte Chemokininduktion in diversen primären Fibroblasten zu vergleichen, wurden dermale und synoviale sowie Lungen- und Cervixfibroblasten mit OSM stimuliert (Abb.30A). Mit Hilfe von *RNase Protection Assays* konnten dann die mRNA-Spiegel von CCL2, CCL11 und CCL13 verglichen werden. Während OSM die Transkription von CCL2 in allen getesteten Fibroblastentypen

induziert (Abb.30A; oberer Blot), ist die Induktion von CCL11 und CCL13 auf einzelne Fibroblastenarten beschränkt. CCL11 wird nur in dermalen, CCL13 nur in synovialen Fibroblasten transkribiert (Abb.30A; zweiter und dritter Blot).

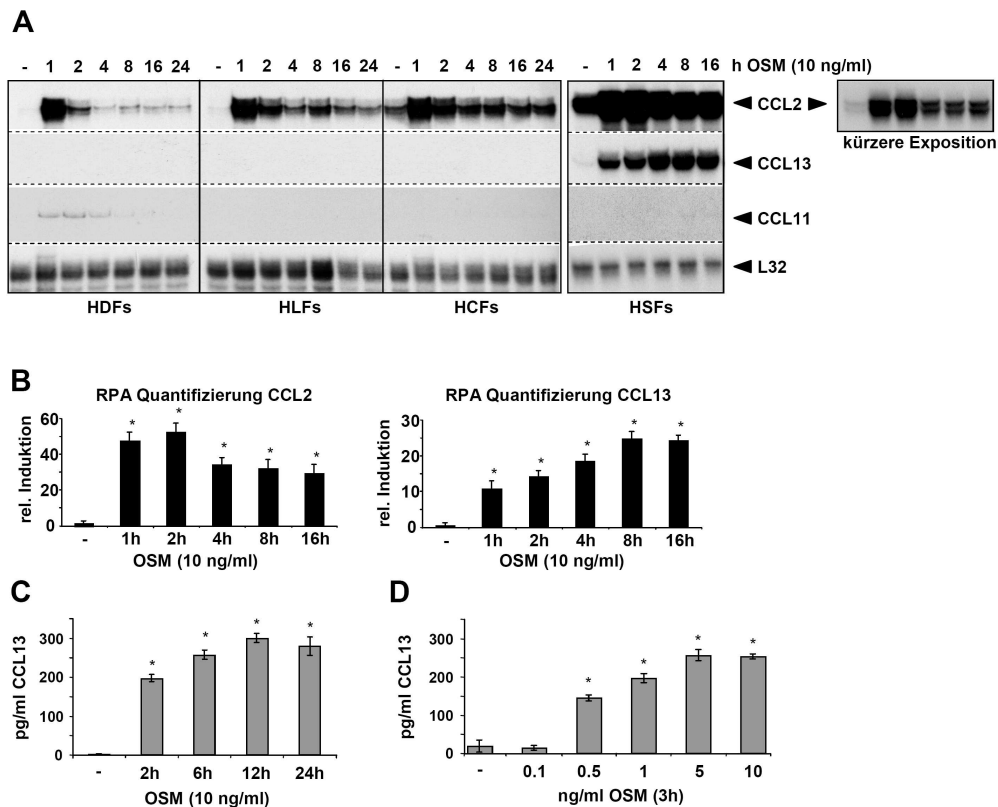


Abb.30: Die OSM-induzierte CCL13-Expression ist auf synoviale Fibroblasten beschränkt

(A) HDFs, HLFs, HCFs und HSFs wurden für die aufgeführten Zeiträume mit 10ng/ml OSM stimuliert. Die CCL2-, CCL11- und CCL13-mRNA-Spiegel wurden mit Hilfe von RPAs bestimmt. Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ist abgebildet. (B) Die RPA-Resultate für synoviale Fibroblasten wurden mit Hilfe eines *Phosphoimager* quantifiziert. Die erhaltenen Werte für CCL2 und CCL13 wurden gegen die entsprechenden GAPDH-Werte normalisiert und als relative Induktion zum Wert der unstimulierten Proben aufgetragen. Werte \pm S.D. (n = 3). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert. (C) HSFs wurden mit 10ng/ml OSM für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Die im Zellüberstand vorhandenen CCL13-Mengen konnten mittels ELISA bestimmt werden. Werte \pm S.D. (n = 4). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert. (D) HSFs wurden 3 h mit ansteigenden Dosen OSM stimuliert, um die sezernierten CCL13-Mengen dann im Zellüberstand nachweisen zu können. Werte \pm S.D. (n = 4). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert.

Darüberhinaus sind in dermalen Fibroblasten bereits 4 h nach Beginn der OSM-Stimulation nur noch Chemokin-mRNA-Spiegel detektierbar, die nahezu den basalen Konzentrationen entsprechen. In synovialen Fibroblasten befinden sich

die induzierten mRNA-Spiegel auch 16 h nach der Stimulation noch deutlich oberhalb der basalen Transkription (Abb.30A und B). Im Gegensatz zu CCL2, dessen stärkste Transkription innerhalb der ersten 2 Stunden erfolgt, erreicht die CCL13-mRNA erst nach 8 h ihren Maximalwert und bleibt bis zu mindestens 16 h konstant (Abb.30B). Diesen Ergebnissen entsprechend sind die höchsten CCL13-Proteinmengen nach 12 h nachweisbar (Abb.30C). Die im Zellüberstand synovialer Fibroblasten detektierbaren CCL13-Mengen steigen abhängig von der OSM-Dosis an. Bereits 500pg/ml OSM führen zu einer deutlich nachweisbaren Transkription von CCL13, dessen Proteinmaximalwert bei einer Stimulation mit 5ng/ml erreicht wird (Abb.30D).

Die Analyse der Zellüberstände aller übrigen Fibroblastentypen wie auch einer zusätzlichen Chondrozytenzelllinie (C20/A4) bestätigt die auf mRNA-Ebene erhaltenen Resultate. Die OSM-induzierte Expression von CCL13 ist auch auf Proteinebene auf synoviale Fibroblasten beschränkt, während alle Zelltypen infolge eines OSM-Stimulus CCL2 exprimieren können (Abb.31).

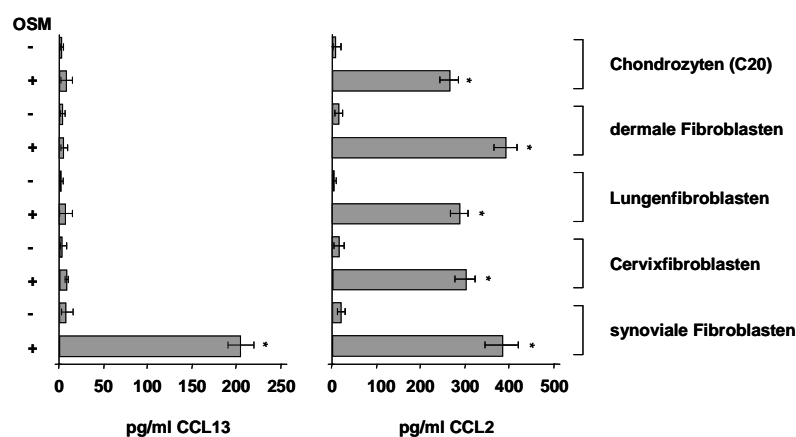


Abb.31: Die OSM-induzierte CCL2-Expression erfolgt unabhängig vom Fibroblastentyp

(A) HDFs, HLFs, HCFs, HSFs und Chondrozyten wurden 3 h mit 10ng/ml OSM stimuliert. Die im Zellüberstand vorhandenen CCL2- und CCL13-Mengen wurden mittels ELISA bestimmt. Werte \pm S.D. (n = 4). * = $p < 0.05$ gegen den Kontrollwert.

III.3.2 Durch die Sekretion von OSM induzieren primäre Neutrophile die Expression von CCL13

Um die Bedeutung von OSM für den Krankheitsverlauf einer rheumatoiden Arthritis im physiologischen Zusammenhang besser nachahmen zu können, sollte im Weiteren untersucht werden, ob durch primäre Immunzellen freigesetztes OSM die Induktion von CCL13 in synovialen Fibroblasten einleiten kann. Aus diesem Grund wurden Neutrophile aus frischen *buffy coats* isoliert und anschließend mit dem *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) stimuliert. 3 h nach der Stimulation mit GM-CSF sind bis zu 800ng/ml OSM im Zellüberstand der Neutrophilen detektierbar (Abb.32A). Um zu überprüfen, ob dieses sezernierte OSM eine CCL13-Induktion hervorrufen kann, wurde der Zellüberstand der Neutrophilen auf synoviale Fibroblasten übertragen (Abb.32B). Wie erwartet ist eine deutliche CCL13-Expression nachweisbar (Abb.32B; Säule 4). Der Einsatz eines OSM-blockierenden Antikörpers verhindert eine Induktion von CCL13 nahezu vollständig (Abb.32B; Säule 6). Dies verdeutlicht, dass kein anderes, möglicherweise im Neutrophilenüberstand enthaltenes Zytokin die Sekretion von CCL13 in HSFs ermöglichen kann.

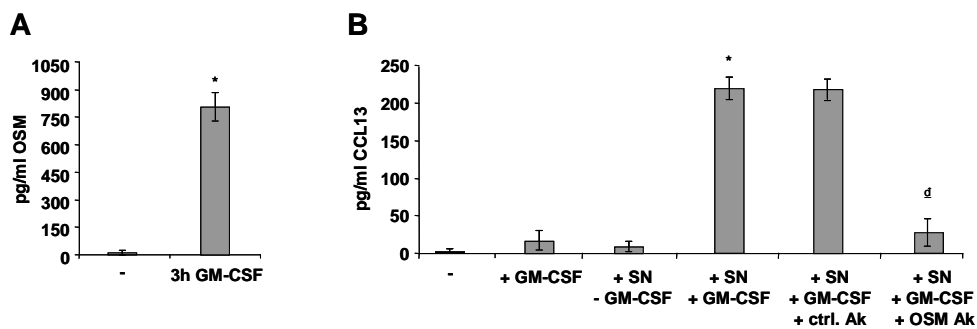


Abb.32: Die GM-CSF-induzierte OSM-Sekretion durch neutrophile Granulozyten

(A) Primäre, neutrophile Granulozyten wurden 3 h mit 10ng/ml GM-CSF stimuliert. Die im Zellüberstand vorhandenen OSM-Mengen konnten mit Hilfe eines ELISAs bestimmt werden. Werte \pm S.D. (n = 3). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert. **(B)** Humane neutrophile Granulozyten wurden wie in (A) beschrieben stimuliert. Die Zellüberstände wurden dann auf HSFs übertragen, um das Potential des sezernierten OSM auf die Fähigkeit hin zu überprüfen, CCL13 in synovialen Fibroblasten zu induzieren. Die letztlich im Zellüberstand vorhandenen CCL13-Mengen konnten mittels eines ELISA bestimmt werden. Werte \pm S.D. (n = 4). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert; ^d = p < 0.05 gegen den Antikörper-Kontrollwert.

III.3.3 Die CCL13-Induktion in HSFs wird vornehmlich durch OSM und nicht durch IL-1 β , IL-6 oder TNF α vermittelt

Um auf direktem Wege den Einfluss von anderen prominenten Schlüsselzytokinen der rheumatoiden Arthritis auf die Expression von CCL13 zu untersuchen, wurden die CCL13-mRNA- und Proteinspiegel von OSM-, IL-6-, IL1 β - oder TNF α -stimulierten HSFs analysiert. Weder eine zweistündige Stimulation mit IL-6, noch mit TNF α induziert eine signifikante CCL13-Induktion (Abb.33A). Während auch IL-1 β nur als sehr schwacher CCL13-Induktor in Erscheinung tritt, führt OSM zu einer 12-13fachen Hochregulation von CCL13-mRNA (Abb.33A).

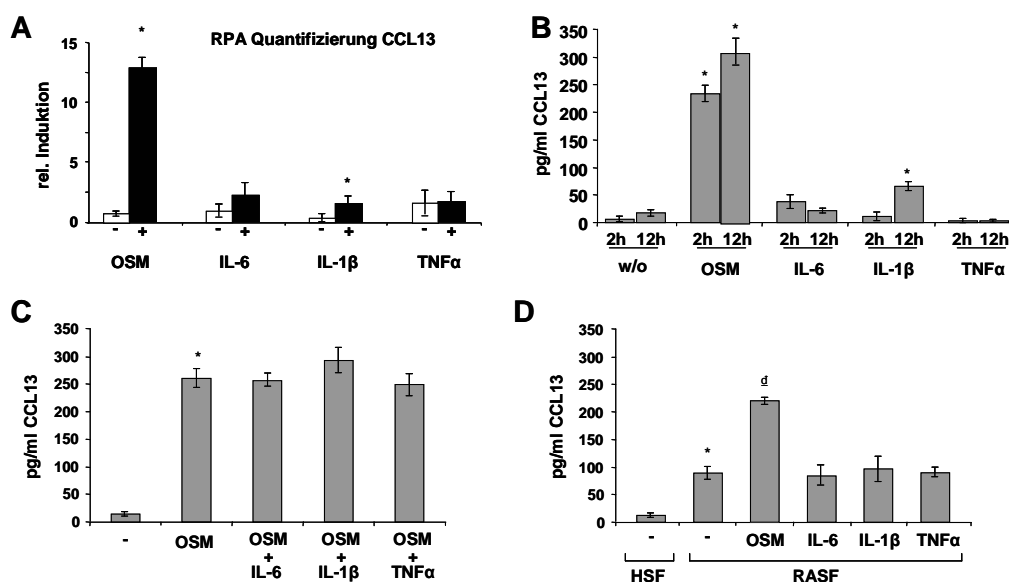


Abb.33: Die Bedeutung von OSM und anderen RA-Schlüsselzytokinen für die Expression von CCL13

(A) HSFs wurden 2 h mit 10ng/ml OSM, 200U IL-6 (in Kombination mit 0,5 μ g/ml sIL-6R), 10ng/ml IL-1 β oder 10ng/ml TNF α stimuliert. Die CCL13-mRNA-Spiegel wurden mit Hilfe von RPAs bestimmt und mit Hilfe eines *Phosphoimager* quantifiziert. Die erhaltenen Werte für CCL13 wurden gegen die entsprechenden GAPDH-Werte normalisiert und als relative Induktion zum Wert der unstimulierten Proben aufgetragen. Werte \pm S.D. (n = 4). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert. (B) HSFs wurden 2 h bzw. 12 h wie in (A) beschrieben stimuliert. Die CCL13-Proteinmengen wurden daraufhin mittels ELISA ermittelt. Werte \pm S.D. (n = 4). * = p < 0.05 gegen den zeitspezifischen Kontrollwert. (C) HSFs wurden 3 h mit OSM (10ng/ml) allein oder in Kombination mit den in (A) beschriebenen Konzentrationen von IL-6, IL-1 β und TNF α stimuliert. Anschließend wurden die exprimierten CCL13-Mengen mit Hilfe eines ELISAs im Zellüberstand nachgewiesen. Werte \pm S.D. (n = 4). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert. (D) RASFs wurden mit den in (A) beschriebenen Zytokinen stimuliert und die CCL13-Mengen mittels ELISA bestimmt. Werte \pm S.D. (n = 4). * = p < 0.05 gegen den HSF-Kontrollwert; ^d = p < 0.05 gegen den Kontrollwert.

Vergleichbare Resultate liefert eine 12stündige Stimulationsreihe von HSFs mit diesen Zytokinen (Daten nicht gezeigt). Den Beobachtungen auf RNA-Ebene entsprechend ist die CCL13-Expression nach einer OSM-Stimulation signifikant erhöht, während nach 12 h IL-1 β -Stimulation nur geringe Mengen von ungefähr 60pg/ml CCL13 und nach IL-6- und TNF α -Stimulation nahezu kein CCL13 nachweisbar ist (Abb.33B). Abbildung 33C zeigt, dass IL-6, IL-1 β und TNF α ebenfalls nicht befähigt sind, die CCL13-Sekretion in HSFs in Synergie mit OSM zu steigern.

Um die bis hierher erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde im Folgenden der Einfluss der beschriebenen Zytokine auf die CCL13-Expression in synovialen Fibroblasten von RA-Patienten (RASFs) analysiert (Abb.33D). Interessanterweise exprimieren RASFs im Gegensatz zu synovialen Fibroblasten von gesunden Spendern bereits im unstimulierten Zustand etwa 100pg/ml CCL13 (Abb.33D; Säule 2). Während diese basalen Mengen CCL13 (100pg/ml) durch eine Stimulation mit OSM mehr als verdoppelt werden können, haben IL-6, IL-1 β und TNF α keinen weiteren stimulatorischen Einfluss auf die CCL13-Expression (Abb.33D; Säulen 4 bis 6).

Da RASFs konstitutiv CCL13 sezernieren, sollte als nächstes analysiert werden, ob die Fibroblasten rheumatoider Patienten auch konstitutiv OSM sezernieren. Wie die Ergebnisse entsprechender OSM-ELISAs zeigen, lassen sich bei einigen Spendern ca. 50pg/ml OSM im RASF-Zellüberstand nachweisen (Abb.34; Tabelle). Im Folgenden sollte die Bedeutung dieser basalen OSM-Sekretion für die CCL13-Expression in stimulierten und unstimulierten Fibroblasten untersucht werden. Um im Zellüberstand von unstimulierten und stimulierten RASFs eine vollständige OSM- und CCL13-Depletion sicher zu stellen, wurden zwei Depletionsdurchgänge mit einem OSM-spezifischen Antikörper (Abb.34; Tabelle) und eine abschließende CCL13-Depletion durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Um die fortlaufende konstitutive OSM-Sekretion zu blocken, musste dem Überstand weiterer OSM-neutralisierender oder Kontrollantikörper zugesetzt werden. Drei Stunden nach der Rückführung des OSM- bzw. CCL13-depletierten Zellüberstands auf die unstimulierten RASFs konnte die erneute CCL13-Produktion der Fibroblasten bestimmt werden. Tatsächlich kann man äquivalente

CCL13-Mengen messen (Abb.34; Säule 6), die sich zuvor auch schon im undepletierten Zellüberstand kontinuierlich gewachsener RASFs nachweisen ließen (Abb.33D; Säule 2).

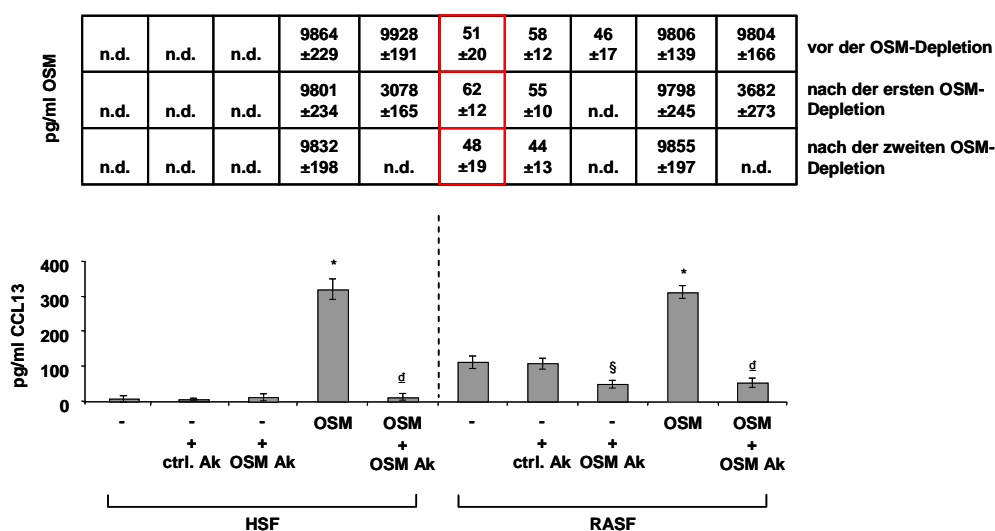


Abb.34: Die konstitutive CCL13-Expression in synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis

HSFs und RASFs wurden 30 min jeweils mit OSM und mit einem OSM-blockierenden Antikörper bzw. einem Kontrollantikörper stimuliert. Nach einer doppelten OSM-Depletion, die mit Protein-A-Sepharose durchgeführt wurde, konnte mittels Protein-G-Sepharose und einem CCL13-neutralisierenden Antikörper eine einfache CCL13-Depletion durchgeführt werden. Die Kontrolle erfolgte mit Hilfe entsprechender ELISAs. Die erhaltenen OSM-Werte sind in der oberen Tabelle dargestellt. CCL13 wurde komplett aus allen Proben depletiert (Daten nicht gezeigt). Im Anschluss daran wurden wiederum HSFs und RASFs mit den depletierten Überständen 3 h stimuliert. Die finalen CCL13-Proteinmengen im Zellüberstand wurden erneut mittels ELISA nachgewiesen. Werte \pm S.D. (n = 3). * und § = p < 0.05 gegen den Kontrollwert; d = p < 0.05 gegen den Kontrollwert.

Der Block einer fortlaufenden basalen OSM-Sekretion resultiert allerdings in einer 50%igen Reduktion der konstitutiven CCL13-Produktion (Abb.34; Säule 8). Wie schon zuvor beschrieben sezernieren HSFs ohne OSM-Stimulation kein CCL13 (Abb.34; Säulen 1 bis 3). Die durch exogenes OSM induzierte CCL13-Sekretion in HSFs und RASFs kann durch eine wiederholte OSM-Depletion komplett unterdrückt werden (Abb.34; Säulen 5 und 10), wenngleich RASFs auch in Gegenwart von OSM-blockierenden Antikörpern weiterhin ca. 50pg/ml CCL13 sezernieren (Abb.34; Säulen 8 und 10).

Fortführende Experimente sollten zeigen, ob RASFs neben OSM weitere Faktoren sezernieren, die auf HSFs eine CCL13-Expression induzieren können. Der

einfache Transfer von RASF-Zellüberständen auf HSFs erlaubt es, nach einer 3stündigen Inkubation ca. 130pg/ml CCL13 im Überstand zu messen (Abb.35C; Säule 2). Offensichtlich enthält dieser Überstand ungefähr 100pg/ml CCL13, das zuvor von RASFs produziert wurde (Abb.35A; Säule 1 und 2). Aus diesem Grund wurde aus anderen Zellüberständen konstitutiv exprimiertes CCL13 depletiert (Abb.35A; Säule 3) und diese erneut auf HSFs transferiert.

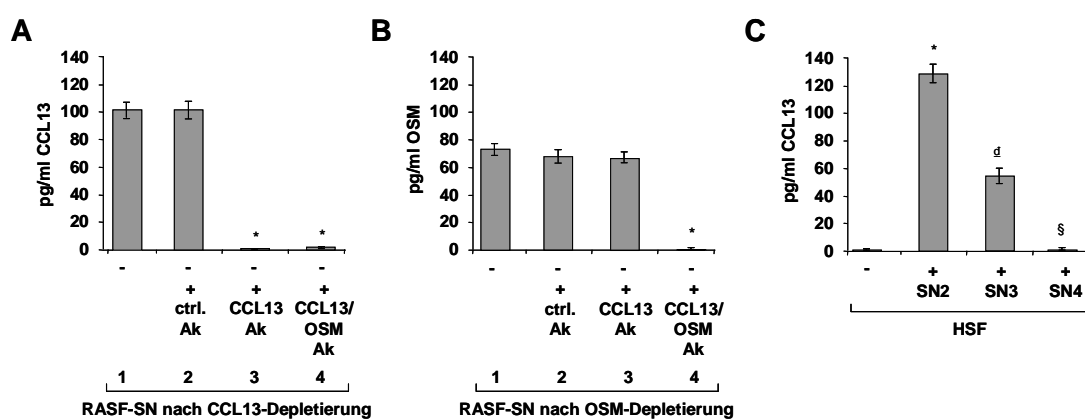


Abb.35: Die konstitutive OSM-Expression in RASFs induziert die CCL13-Expression in HSFs

(A) und (B) Überstände von RASFs wurden 30 min mit neutralisierenden Kontroll-, CCL13- oder CCL13- und OSM-Antikörpern inkubiert. Die OSM- bzw. CCL13-Proteinmengen wurden mit Hilfe von Protein-A/G-Sepharose depletiert und die erfolgreiche Depletion letztlich über ELISA nachgewiesen. (C) Die zuvor hergestellten, depletierten Zellüberstände wurden dann auf unstimulierte HSFs überführt. Die finalen CCL13-Konzentrationen im Zellüberstand wurden erneut mittels ELISA bestimmt. Werte \pm S.D. (n = 3). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert; ^d = p < 0.05 gegen den Kontroll-SN; [§] = p < 0.05 gegen den nur CCL13-depletierten SN.

Da HSFs interessanterweise weiterhin befähigt sind, geringe Mengen von 50-60pg/ml CCL13 zu sezernieren (Abb.35C; Säule 3), deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass RASFs einen löslichen Faktor ausschütten, der die CCL13-Expression in HSFs induzieren kann. Vorherige Ergebnisse und die Tatsache, dass eine weitere Depletion von OSM aus RASF-Zellüberstand (Abb.35B; Säule 4) die komplette CCL13-Expression in HSFs unterdrückt (Abb.35C; Säule 4), belegen, dass es sich bei dem sezernierten Faktor um OSM handelt. Oncostatin M ist damit der einzige lösliche Faktor, der von RASFs sezerniert wird und eine CCL13-Expression induzieren kann. Darüberhinaus bleibt festzuhalten, dass RASFs einen intrinsischen Faktor zur CCL13-Expression besitzen und sie sich damit von den

HSFs unterscheiden. Weiterhin ist es von Bedeutung, dass die konstitutiv exprimierten CCL13- und OSM-Konzentrationen nur in RASF-Zellüberständen nachweisbar sind. Weder in den getesteten HSFs, noch in den OASFs lassen sich basal sezernierte Mengen OSM oder CCL13 messen (Abb.36). Interessanterweise scheinen sich die analysierten Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis in zwei Gruppen aufzuteilen. Die „Typ-I-RASFs“ (Abb.36A) produzieren konstitutiv geringe Mengen OSM und entsprechend höhere CCL13-Konzentrationen, als die kein OSM sezernierenden „Typ-II-RASFs“ (Abb.36B).

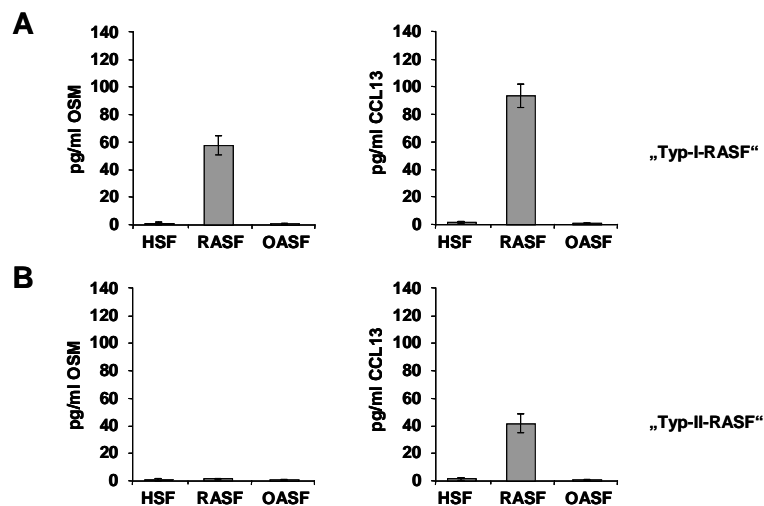


Abb.36: Eine konstitutive OSM- und CCL13-Expression findet sich in RASFs, nicht aber in HSFs und OASFs

(A) und (B) HSFs, RASFs und OASFs wurden 3 h mit 10ng/ml OSM stimuliert. Die OSM- und CCL13-Proteinmengen in Zellüberständen unstimulierter HSFs, RASFs und OASFs wurden mit Hilfe von ELISAs bestimmt.

III.3.4 Sezerniertes CCL13 induziert die Migration von primären Monozyten

Die entscheidende physiologische Konsequenz einer Chemokinsekretion ist die anschließende Rekrutierung von Immunzellen zum Ort der Chemokinproduktion. Migrationsassays in modifizierten Boyden Kammern sollten nachfolgend verdeutlichen, welches Potential CCL13 zur Rekrutierung primärer Monozyten besitzt (Abb.37). Wie aufgrund der niedrigen konstitutiven CCL13-Produktion in

RASFs erwartet, induzieren die Zellüberstände dieser Zellen eine Migration von ungefähr 30% aller ins obere Reservoir der Boyden Kammer eingesetzten Monozyten (Abb.37A; Säule 3). Der Einsatz von CCL13- und CCL2-neutralisierenden Antikörpern bewirkt jeweils eine signifikante Reduktion der basalen Monozytenmigration (Abb.37A; Säulen 5 und 6).

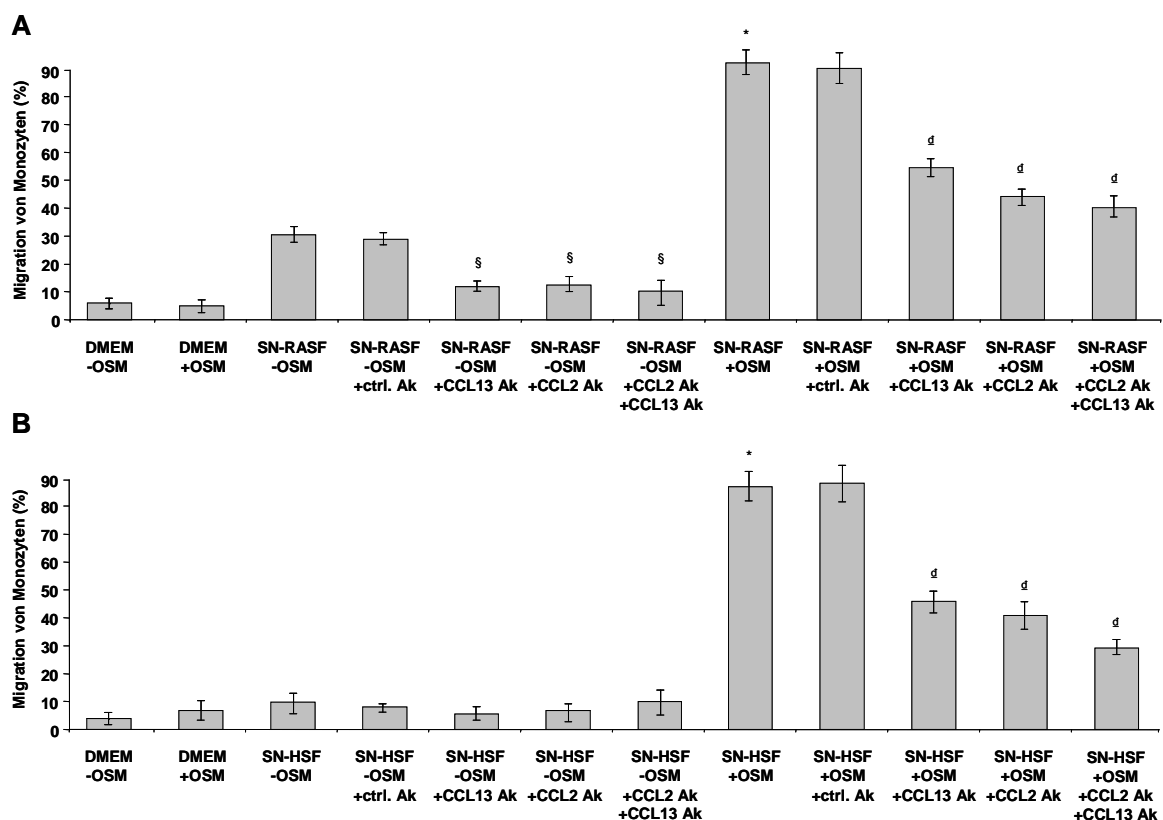


Abb.37: OSM-induziertes CCL13 vermittelt die Migration von primären Monozyten

RASFs (**A**) und HSFs (**B**) wurden 3 h mit 10ng/ml OSM stimuliert. Mit Hilfe der Zellüberstände wurde das Potential der sezernierten Chemokine zur Rekrutierung primärer Monozyten in einer modifizierten Boyden Kammer analysiert. Die Anzahl der migrierten Monozyten wurde bestimmt und mit den Werten der Kontrollversuche verglichen. Werte \pm S.D. (n = 3). * = $p < 0.05$ gegen den Kontrollwert; d und § = $p < 0.05$ gegen die Antikörperkontrolle.

Die simultane Inhibition beider Chemokine hat keinen weiteren reduzierenden Effekt auf die durch RASF-Zellüberstände vermittelte basale Migration (Abb.37A; Säule 7). Da synoviale Fibroblasten von gesunden Spendern nicht konstitutiv Chemokine produzieren, kann hier auch keine basale Migration beobachtet werden (Abb.37B; Säulen 1 bis 7). Dagegen führen Zellüberstände von OSM-

stimulierten RASFs und HSFs zu einer Migration von bis zu 90% aller eingesetzten Monozyten (Abb.37A und B; Säule 8). Eine Blockade von CCL2 bzw. CCL13 durch neutralisierende Antikörper resultiert wiederum in einer starken Reduktion der Monozytenmigration (Abb.37A und B; Säulen 10 und 11).

Zusammenfassend zeigen diese Resultate also, dass OSM die Migration von primären Monozyten über RASF- und HSF-sezernierte Faktoren induziert und die Chemokine CCL2 und CCL13 dabei von signifikanter Bedeutung sind.

III.3.5 Eine verlängerte STAT5-Aktivierung ermöglicht die OSM-induzierte CCL13-Expression

Frühere Studien legen nahe, dass sowohl der JAK/STAT-Signalweg, als auch die MAPK-Kaskaden über ERK1/2 und p38 für die Expression von inflammatorischen Chemokinen wichtig sind. Um die genauen molekularen Mechanismen aufzuklären, die für die OSM-spezifische CCL13-Transkription von Bedeutung sind, sollte das Aktivierungsprofil von HSFs nach Stimulation mit OSM, IL-6, IL-1 β und TNF α miteinander verglichen werden (Abb.38A). Erwartungsgemäß wird STAT3 sehr gut durch OSM und IL-6/sIL-6R aktiviert, während STAT1 insbesondere stark durch OSM, in geringerem Maße aber auch durch IL-6/sIL-6R phosphoryliert wird. Eine deutliche Aktivierung von ERK1/2 und p38 kann nach einer Stimulation mit OSM und IL-1 β erreicht werden, nicht aber nach Zugabe von IL-6/sIL-6R oder TNF α . Sowohl eine Stimulation mit IL-1 β , als auch mit TNF α bewirkt eine Degradation von I κ B. Zur Aktivierung von STAT5 ist alleinig OSM befähigt. Dosisabhängige Analysen zeigen, dass bereits 0,5ng/ml OSM ausreichen, um eine eindeutige STAT5-Phosphorylierung in HSFs detektieren zu können (Abb.38B). Eine entsprechende Zeitkinetik verdeutlicht, dass eine OSM-induzierte STAT5-Aktivierung auch 8 h nach Stimulationsbeginn noch nachweisbar ist (Abb.38C). Interessanterweise kann OSM in allen getesteten Fibroblastentypen und in Chondrozyten STAT5 aktivieren, aber nur in den CCL13-exprimierenden synovialen Fibroblasten lässt sich eine deutlich verlängerte

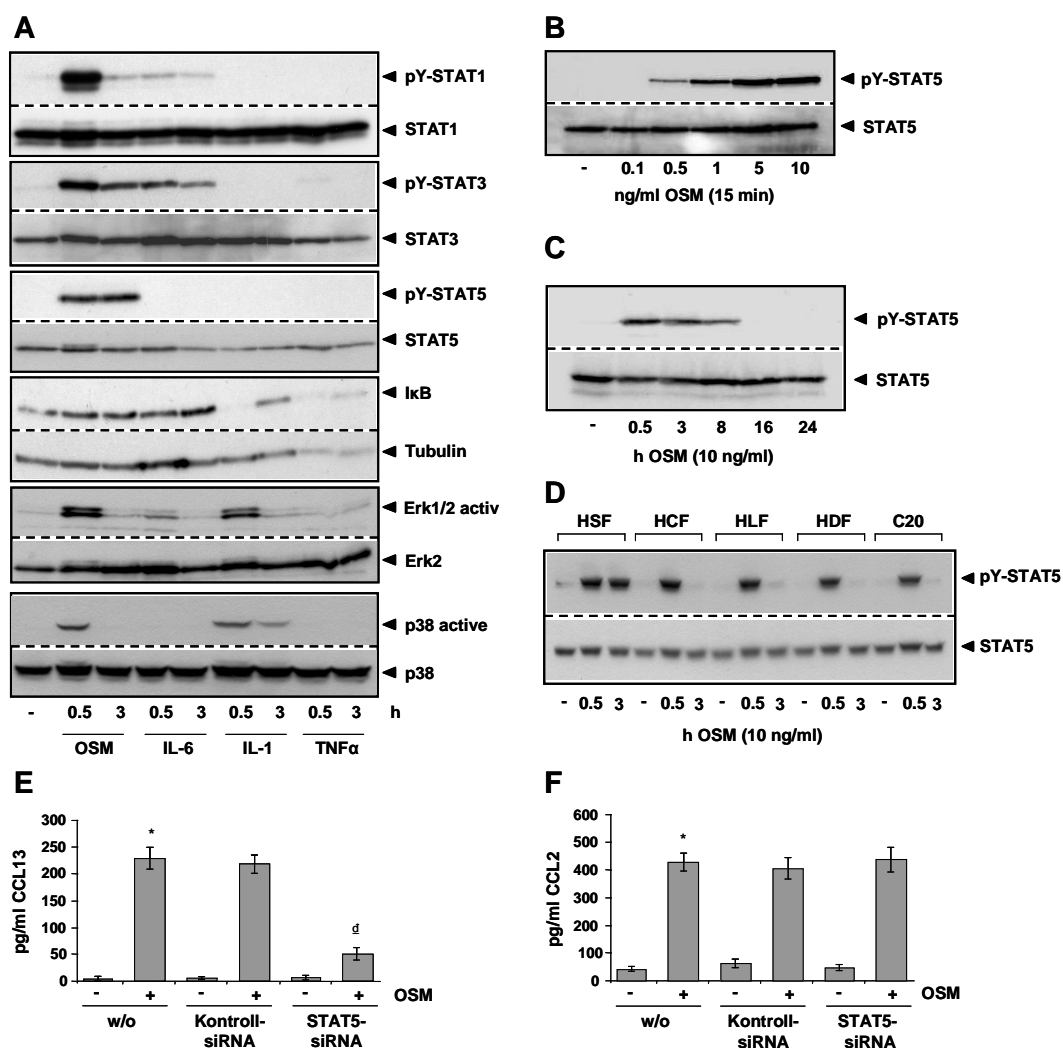


Abb.38: Der Vergleich der OSM-, IL-6-, IL-1 β - und TNF α -vermittelten Signaltransduktion verdeutlicht eine potentielle Rolle von aktiviertem STAT5 für die CCL13-Expression

(A) HSFs wurden 30 min oder 3 h mit 10ng/ml OSM, 200U/ml IL-6 (in Kombination mit 0,5 μ g/ml sIL-6R), 10ng/ml IL-1 β oder 10ng/ml TNF α stimuliert. Lysate wurden über Western Blots aufgearbeitet und die entsprechenden Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen die angeführten Proteine detektiert. (B) und (C) HSFs wurden 15 min mit ansteigenden Dosen OSM bzw. mit 10ng/ml OSM für die dargestellten Zeiträume stimuliert und anschließend lysiert. STAT5 wurde mit spezifischen Antikörpern über einen Western Blot aus aufgearbeiteten Lysaten nachgewiesen. (D) HSFs, HCFs, HLFs, HDFs und Chondrozyten wurden 30 min oder 3 h mit 10ng/ml OSM stimuliert. Äquivalente Lysatmengen wurden wie in (B) beschrieben analysiert. (E) und (F) HSFs wurden mit STAT5-siRNA transfiziert und 48 h später 3 h mit 10ng/ml OSM stimuliert. Die CCL2- und CCL13-Proteinmengen im Zellüberstand wurden mit Hilfe von ELISAs ermittelt. Werte \pm S.D. (n = 4). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert; ^d = p < 0.05 gegen die stimulierte siRNA-Kontrolle.

STAT5-Phosphorylierung nachweisen (Abb.38D). Ein anschließender STAT5-*knock-down* mittels siRNA in HSFs verhindert trotz erfolgter OSM-Stimulation die

Aktivierung von STAT5 (Daten nicht gezeigt) und resultiert in einer signifikant geringeren CCL13-Expression als in den entsprechenden Kontrollansätzen (Abb.38E). Die Expression von CCL2 bleibt vom STAT5-*knock-down* unberührt und wird dementsprechend STAT5-unabhängig reguliert (Abb.38F).

III.3.6 Die OSM-abhängige p38-Aktivierung stabilisiert die CCL13-mRNA über einen TTP-inhibierenden Mechanismus

Die Ergebnisse im ersten Teil dieser Arbeit verdeutlichen, dass JAK2 eine wichtige Rolle für die OSM-induzierte STAT5-Phosphorylierung spielt. Um mit Hilfe dieser Erkenntnis auch die Bedeutung von STAT5 für die CCL13-Expression zu unterstreichen, wurden HSFs mit dem JAK2-Inhibitor AG490 behandelt. Im Hinblick auf die im zweiten Teil dieser Arbeit erzielten Ergebnisse wurden die Zellen in weiteren Ansätzen mit dem p38-Inhibitor SB202190, dem ERK1/2-Inhibitor U0126 und dem JNK-Inhibitor SP600125 behandelt, um den Einfluss der MAP-Kinasen auf die OSM-vermittelte CCL13-Expression näher zu beleuchten (Abb.39A). Wie erwartet führt die Präinkubation mit AG490 zu einer starken Unterdrückung der OSM-induzierten CCL13-Expression. Während die Vorbehandlung mit dem p38-Inhibitor SB202190 vergleichbare Ergebnisse liefert, hat der ERK1/2-Inhibitor U0126 einen deutlich geringeren, aber dennoch signifikanten inhibierenden Effekt. Der Einsatz des JNK-Inhibitors SP600125 hat keine Auswirkung und belegt damit, dass die MAP-Kinasen JNK1/2 keine Bedeutung für die OSM-abhängige CCL13-Expression besitzen. Vom JAK Inhibitor 1 (JI-1) weiß man, dass er alle Janus Kinasen hemmt und deshalb die OSM-induzierte Signaltransduktion vollständig inhibiert (Abb.39B; letzte Spur). Folgerichtig ist keine OSM-abhängige CCL13-Produktion in HSFs nach einer JI-1-Präinkubation mehr nachweisbar (Abb.39A). Ein ähnliches Bild ergibt sich, wenn man die OSM-abhängige CCL13-Produktion in synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis untersucht (Abb.39C Säulen 7 bis 12). Erneut erweisen sich JAK2 und p38 sowie in geringerem Maße auch ERK1/2 als besonders bedeutungsvoll. Beachtlicherweise verändert sich die Relevanz der einzelnen Kinasen, wenn man die konstitutive CCL13-Expression in RASFs analysiert. Während JAK2 in keiner Weise zur basalen Produktion von CCL13

beiträgt und der Einsatz des JI-1 eine 50%ige CCL13-Reduktion bewirkt, besitzen p38 und ERK1/2 beide eine gleichermaßen wichtige Rolle, die durch eine komplette Unterdrückung der CCL13-Expression bei Präinkubation mit den jeweils spezifischen Inhibitoren ersichtlich wird (Abb.39C; Säulen 2 bis 6).

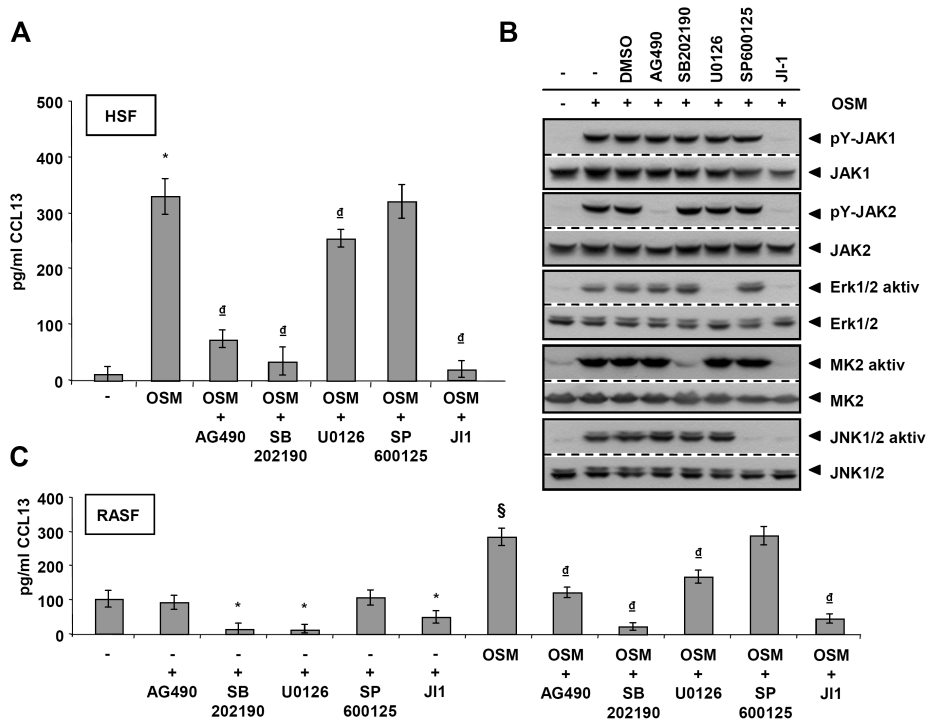


Abb.39: Die MAPK p38 und ERK1/2 haben ebenfalls Einfluss auf die OSM-vermittelte Expression von CCL13

HSFs (**A**) und RASFs (**C**) wurden 30 min mit 10 μ M AG490, 10 μ M SB202190, 10 μ M U0126, 10 μ M SP600125 oder 10 μ M JAK Inhibitor 1 vorinkubiert und anschließend 3 h mit 10ng/ml OSM stimuliert. Daraufhin wurden die CCL13-Konzentrationen im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Werte \pm S.D. (n = 4). * und § = p < 0.05 gegen den Kontrollwert; ^d = p < 0.05 gegen den OSM-stimulierten Wert. (**B**) Um die Effizienz der in (A) und (C) eingesetzten Inhibitoren zu ermitteln, wurden die aktivierten Formen von JAK1, JAK2, ERK1/2, MK2 und JNK1/2 in HSF-Zelllysaten nachgewiesen.

Um die Bedeutung von aktiviertem p38 für die OSM-induzierte CCL13-Expression genauer zu untersuchen und die dahinterstehenden molekularen Mechanismen zu verstehen, sollte im Folgenden mit Anlehnung an entsprechende Versuche aus dem zweiten Teil dieser Arbeit die mRNA-Stabilität von CCL13 in Gegenwart und Abwesenheit einer p38-Aktivierung analysiert werden (Abb.40A). Aus diesem Grund wurden HSFs 30 min mit OSM stimuliert, um eine CCL13-Transkription zu

initiieren. Anschließend wurde das OSM-haltige Medium entfernt und die Zellen 20 min mit Actinomycin D behandelt.

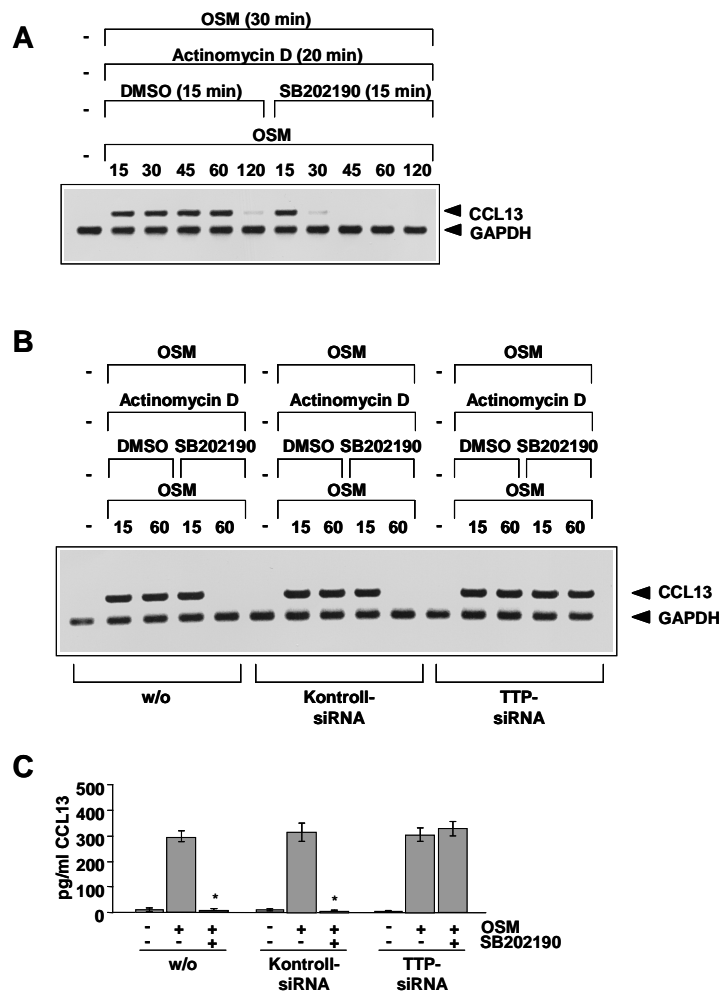


Abb.40: OSM-aktiviertes p38 stabilisiert CCL13-mRNA über einen TTP-inhibierenden Mechanismus

(A) HSFs wurden 30 min mit 20ng/ml OSM stimuliert. Daraufhin wurden die Zellen gewaschen und zusätzlich weitere 20 min in OSM-freiem Medium mit Actinomycin D (4 μ M) inkubiert, um eine fortlaufende Transkription zu blocken. Bevor dann eine abschließende, zweite Stimulation mit OSM für die angegebenen Zeiträume erfolgte, wurden 10 μ M SB202190 hinzugegeben. CCL13- und GAPDH-mRNA-Spiegel wurden mit Hilfe einer RT-PCR ermittelt. (B) HSFs wurden wie im Material und Methoden Abschnitt erläutert mit TTP-siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen wie in (A) beschrieben behandelt und der Versuchsansatz entsprechend ausgewertet. (C) HSFs wurden erneut mit TTP-siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen 20 min mit 10 μ M SB202190 vorbehandelt, um dann 3 h mit 10ng/ml OSM stimuliert zu werden. Die CCL13-Proteinmengen in den Zellüberständen wurden mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Werte \pm S.D. (n = 3). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert.

In An- oder Abwesenheit des p38-Inhibitors SB202190 konnte durch einen zweiten OSM-Stimulus die OSM-abhängige Signalkaskade erneut aktiviert werden. Abbildung 40A zeigt, dass die durch die primäre OSM-Stimulation induzierte CCL13-mRNA erst 120 min nach der sekundären Stimulation degradiert wird. Die Zugabe von SB202190 in den Zellüberstand verhindert durch die hervorgerufene Inhibition von p38 eine ähnlich lange Stabilisierung der CCL13-mRNA und bewirkt eine Degradation bereits 30 min nach dem zweiten OSM-Stimulus.

Wie bereits im zweiten Teil der Arbeit erläutert, kann die Stabilisierung AU-reicher mRNAs durch die p38-abhängige Phosphorylierung und anschließende Degradation des mRNA-destabilisierenden Proteins Tristetraprolin vermittelt werden. Folglich sollte wie im Falle von CCL1 auch die CCL13-mRNA in TTP-*knock-down*-Zellen unabhängig von der p38-Kinaseaktivität stabilisiert werden. Abbildung 40B bestätigt diese These, indem sie eine verlängerte Halblebenszeit von CCL13-mRNA in HSFs aufzeigt, die mit TTP-siRNA transfiziert und gleichzeitig mit SB202190 inkubiert wurden (Abb.40B; Spalten 5 und 15). Im Einklang mit diesem Ergebnis steht außerdem das Resultat, das in Abbildung 40C dargestellt ist. Die durch Präinkubation mit dem p38-Inhibitor hervorgerufene, starke CCL13-Reduktion in HSF-Zellüberständen wird durch eine erfolgte Transfektion mit TTP-siRNA aufgehoben (Abb.40C; Säulen 3 und 9).

III.3.7 Die gemeinsame Hemmung von STAT5 und ERK1/2 führt zu einer reduzierten Monozytenrekrutierung

Um jeweils den individuellen Beitrag von STAT5 und ERK1/2 zur OSM-vermittelten CCL13-Expression zu analysieren, wurden RAFSs mit STAT5-siRNA transfiziert und zusätzlich mit dem spezifischen MEK1-Inhibitor U0126 inkubiert (Abb.41). Die bisherigen, mit dem JAK2-Inhibitor erhaltenen und zusätzlich die in Abbildung 38E dargestellten Ergebnisse bestätigend, zeigt der *knock-down* von STAT5, dass die OSM-induzierte CCL13-Expression in RAFSs die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors benötigt (Abb.41; Säulen 2 und 8) und die Inhibierung von ERK1/2 nur einen partiellen Effekt auf die Chemokinexpression hat (Abb.41; Säulen 2 und 3). Die Kombination einer STAT5- und ERK1/2-Inhibition bewirkt

dagegen eine komplette Reduktion der OSM-vermittelten CCL13-Produktion (Abb.41; Säule 9).

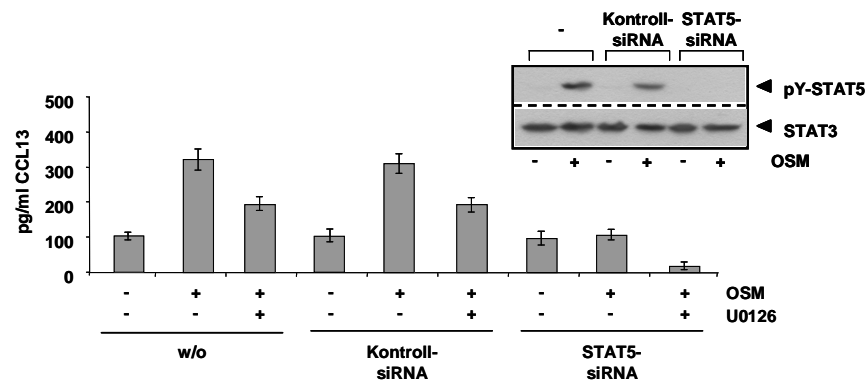


Abb.41: Ein *knock-down* von STAT5 führt zum Verlust der OSM-abhängigen Expression von CCL13 und zieht damit eine reduzierte Rekrutierung von Monozyten nach sich
 RASFs wurden mit STAT5-siRNA transfiziert und 48 h später infolge einer 30minütigen Vorinkubation mit 10 μ M U0126 3 h mit 10ng/ml OSM stimuliert. Um die Effizienz des *knock-down* zu bestimmen, wurde aktiviertes STAT5 mit einem phosphospezifischen STAT5-Antikörper aus Zelllysaten detektiert. Abschließend wurden die CCL13-Konzentrationen im Zellüberstand mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Werte \pm S.D. (n = 4).

III.4 Der Einfluss von Oncostatin M auf den antiviralen Status von Lungenfibroblasten

Die Bedeutung von RIG-I-like-receptors (RLRs) für das angeborene Immunsystem im Kampf gegen virale Infektionen konnte innerhalb der letzten Jahre eindeutig belegt werden (122,148-151). Dennoch ist der molekulare Mechanismus, durch den die Expression dieser Helikasen vermittelt wird, noch weitgehend unverstanden. Erwartungsgemäß lassen sich RIG-I und MDA5 durch IFN α und IFN β induzieren, sodass sie ihrerseits eine verstärkte IFN-Sekretion ermöglichen und somit als *feedback*-Induktoren agieren. Darüberhinaus konnte eine RIG-I-Induktion nach LPS (152,153), IFN (154-156) und poly(I:C) (153) beschrieben werden. Kontrovers wird dagegen die Wirkung von inflammatorischen Zytokinen auf die Transkription der DExD/H-Box Helikasen diskutiert. Diverse Publikationen geben Hinweise darauf, dass Zytokine wie IL-1 β , TNF α oder IL-6 direkten Einfluss auf die antivirale Immunabwehr haben könnten (126,127,157). Interessanterweise

verdeutlicht eine weitere Publikation, dass Oncostatin M befähigt ist, eine Reihe klassischer ISGs (*interferon stimulated genes*) zu induzieren (128). Zusätzlich zeigen institutsinterne Affymetrix® Gene Chips-Daten, dass RIG-I und MDA5 OSM-abhängig stärker als dreifach in ihrer Transkription verändert werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte deshalb die mögliche Bedeutung von OSM für den Verlauf einer antiviralen Immunantwort näher beleuchtet werden.

III.4.1 Die RNA-Helikasen RIG-I und MDA5 sind *immediate-early* Gene von Oncostatin M

Primäre humane Lungenfibroblasten (HLFs) und dermale Fibroblasten (HDFs) wurden für die in Abbildung 42 aufgezeigten Zeiträume mit OSM oder IFN γ stimuliert.

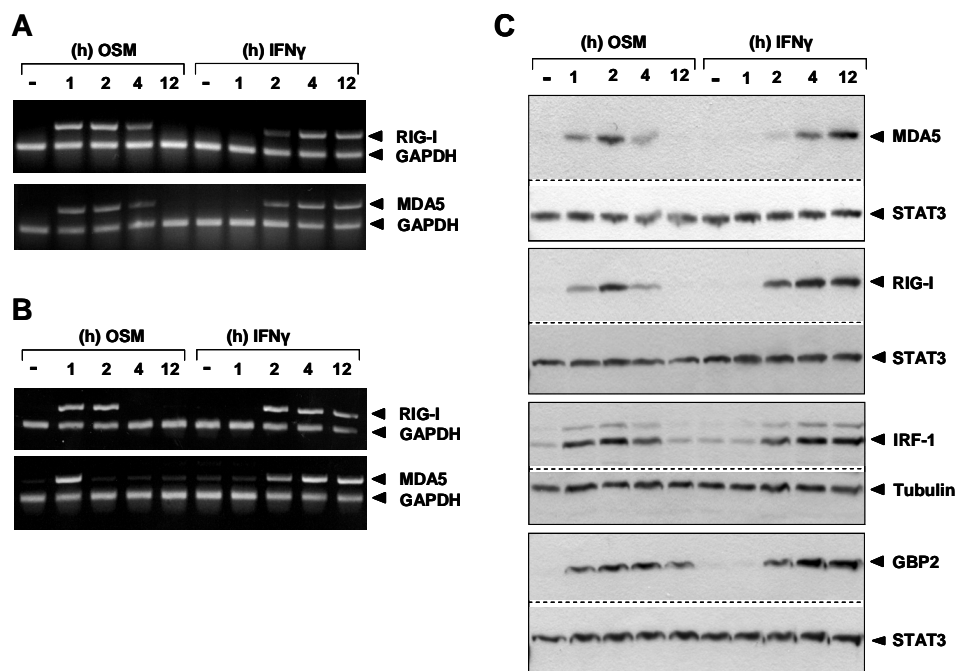


Abb.42: Die OSM-induzierte Expression von RIG-I und MDA5

(A) HLFs und (B) HDFs wurden für die beschriebenen Zeiträume mit 20ng/ml OSM und 1000U/ml IFN γ stimuliert. RIG-I und MDA5 mRNA-Spiegel wurden mittels RT-PCR bestimmt. (C) HLFs wurden wie in (A) und (B) beschrieben stimuliert. Die hergestellten Lysate wurden über Western Blots aufgearbeitet und mit spezifischen Antikörpern gegen RIG-I, MDA5, IRF1 und GBP2 detektiert. Nach anschließendem *strippen* wurden die Blots mit Antiseren gegen STAT3 und Tubulin gefärbt.

Aus der isolierten mRNA wurde dann mittels RT-PCR die RIG-I- bzw. MDA5-Expression evaluiert (Abb.42A und B). Interessanterweise induziert OSM eine schnelle RIG-I- und MDA5-Transkription, die die IFN γ -induzierte Expression dieser Helikasen zeitlich um mindestens eine Stunde übertrifft. Letztere ist dagegen deutlich weniger transient, sodass die mRNAs der IFN γ -induzierten Helikasen auch nach 12 h noch nachweisbar sind. Eine vergleichbare RIG-I- und MDA5-Expression in humanen Lungenfibroblasten lässt sich auch auf Proteinebene erkennen (Abb.42C). Während eine IFN γ -Stimulation die Expression der Helikasen nach 2h ermöglicht, sind RIG-I und MDA5 in Folge einer OSM-Stimulation bereits nach 1 h nachweisbar (Abb.42C; erster und zweiter Blot). Entsprechende Ergebnisse zeigen die Blots auch im Hinblick auf die Transienz der Helikasen-Expression. Die OSM-induzierte Induktion von RIG-I und MDA5 erreicht nach 2 h ihren Höhepunkt und fällt bereits nach 4 h wieder ab, während die IFN γ -induzierte Expression kontinuierlich 12 h lang ansteigt. Oncostatin M induziert in HLFs aber nicht nur RIG-I und MDA5, sondern zusätzlich auch die ISGs IRF1 und GBP2 (Abb.42C; untere Blots). Während die Kinetik der IRF1-Induktion vergleichbar zu den Kinetiken der induzierten DExD/H-Box Helikasen verläuft, ist GBP2 auch deutlich später (12 h) noch detektierbar. Wie schon für RIG-I und MDA5 beobachtet, erfolgt auch die IRF1- und GBP2-Proteinexpression deutlich schneller als in IFN γ -stimulierten Fibroblasten. Entsprechende Versuche mit dermalen Fibroblasten lieferten vergleichbare Resultate (Daten nicht gezeigt).

III.4.2 Die OSM-induzierte RIG-I-Expression ist auf Fibroblasten beschränkt

Primäre humane Fibroblasten exprimieren gp130, den LIFR und auch den OSMR und können damit potentiell nicht nur auf OSM, sondern u.a. auch auf IL-6 und LIF reagieren. Um herauszufinden, ob die nach OSM-Stimulation beobachtete Expression der DExD/H-Box Helikasen in Fibroblasten spezifisch für OSM ist oder doch ein allgemeines Phänomen für IL-6-Typ Zytokine darstellt, wurden im Folgenden HLFs mit OSM, LIF und IL-6 (in Kombination mit seinem agonistisch wirkenden α -Rezeptor) stimuliert (Abb.43A). Während OSM die Expression von RIG-I induziert, haben weder IL-6 noch LIF einen Einfluss auf die

Proteinexpression der RNA-Helikase. Um herauszufinden, ob die OSM-vermittelte RIG-I-Expression zelltypspezifisch ist, wurden im nächsten Schritt primäre Fibroblasten und die beiden Krebszelllinien U2OS bzw. HepG2 vergleichend mit OSM stimuliert. Interessanterweise sind trotz starker STAT1- und STAT3-Tyrosinphosphorylierung (Abb.43C; oberer Blot und Daten nicht gezeigt) weder die U2OS-, noch die HepG2-Zellen befähigt, RIG-I nach OSM-Stimulation zu exprimieren (Abb.43B). Da aber die vollständige STAT1/3-Tyrosinphosphorylierung eine vorhandene OSM-Responsivität aller Zellen belegt, kann die fehlende RIG-I-Induktion nicht auf einen intrinsischen Zelldefekt zurückzuführen sein.

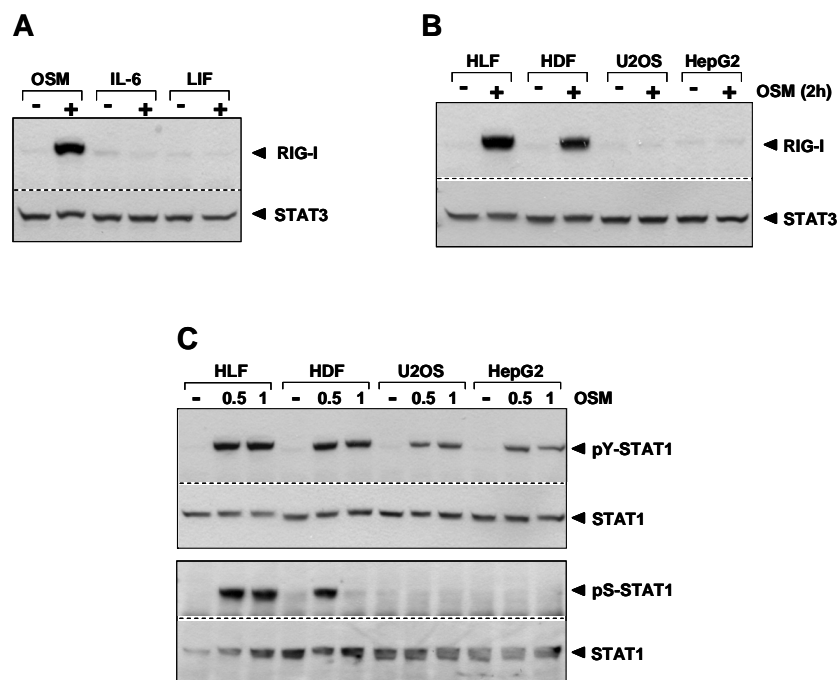


Abb.43: Die OSM-induzierte Expression von RIG-I ist zelltypspezifisch

(A) HLFs wurden 2 h mit 20ng/ml OSM, 100ng/ml LIF oder 200U/ml IL-6 (in Kombination mit 0,5µg/ml sIL-6R) stimuliert und daraufhin lysiert. In Folge einer Western Blot Analyse wurden RIG-I und STAT3 mit spezifischen Antikörpern detektiert. (B) HLFs, HDFs, U2OS und HepG2-Zellen wurden 2 h mit 20ng/ml OSM stimuliert und lysiert. Die Western Blots wurden mit den in (A) beschriebenen Antikörpern entwickelt. (C) HLFs, HDFs, U2OS und HepG2-Zellen wurden 30 min oder 1 h mit 20ng/ml OSM stimuliert. Die hergestellten Lysate wurden mittels Western Blot Analyse aufgearbeitet und mit spezifischen Antikörpern gegen die tyrosin- und serinphosphorylierten Formen von STAT1 gefärbt.

III.4.3 Die Expression von RIG-I erfordert eine gleichzeitige Tyrosin- und Serinphosphorylierung von STAT1

Um die molekularen Mechanismen, die letztlich zur OSM-induzierten Expression der DExD/H-Box Helikasen führen, zu untersuchen, sollte im Weiteren zunächst die STAT1-Aktivierung in den verschiedenen Zelltypen genauer analysiert werden. Wie Abb.43C zeigt, bewirkt OSM in primären Fibroblasten eine leicht stärkere STAT1-Tyrosinphosphorylierung als in den Krebszelllinien (oberer Blot). Da Arbeiten von Decker *et al.* verdeutlichen, dass die transkriptionelle STAT1-Aktivität durch eine zusätzliche Serinphosphorylierung verstärkt wird (158), wurde im zweiten Schritt die STAT1-Phosphorylierung an Serin S₇₂₇ in allen vier Zelltypen untersucht (Abb.43C; unterer Blot). In der Tat ist in primären Fibroblasten eine starke STAT1-Serinphosphorylierung detektierbar, während sie in U2OS- oder HepG2-Zellen komplett fehlt.

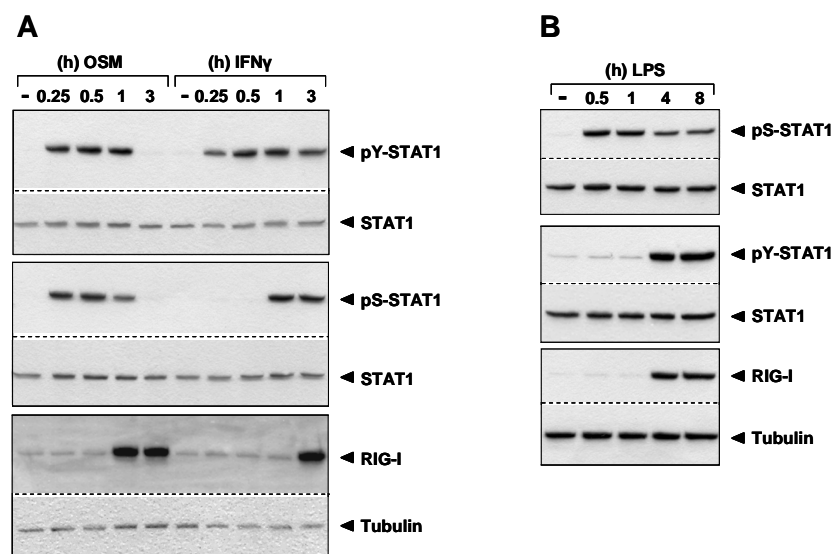


Abb.44: Die OSM-induzierte Expression von RIG-I erfordert die Phosphorylierung des Serins S₇₂₇ in STAT1

(A) und (B) HLFs wurden für die angezeigten Zeiträume mit 20ng/ml OSM, 1000U/ml IFN γ oder 100ng/ml LPS stimuliert. Die hergestellten Lysate wurden mittels Western Blot Analyse aufgearbeitet und mit spezifischen Antikörpern gegen die tyrosin- und serinphosphorylierten Formen von STAT1 bzw. RIG-I gefärbt.

Um im Folgenden die STAT1-Serinphosphorylierung nach OSM und IFN γ direkt vergleichen zu können, wurden HLFs mit beiden Zytokinen für die angegebenen

Zeiträume stimuliert (Abb.44A). Während die Tyrosinphosphorylierung von STAT1 unabhängig vom Zytokinstimulus in beiden Fällen bereits nach 15 min nachweisbar ist (Abb.44A; oberer Blot), ist die OSM-vermittelte STAT1-Serinphosphorylierung deutlich vor der IFN γ -induzierten Aktivierung detektierbar (Abb.44A; mittlerer Blot). Beachtenswert ist dabei die zeitliche Korrelation zwischen erfolgter STAT1-Serinphosphorylierung und erstmaligem Auftreten der RIG-I-Proteinexpression (Abb.44A; unterer Blot).

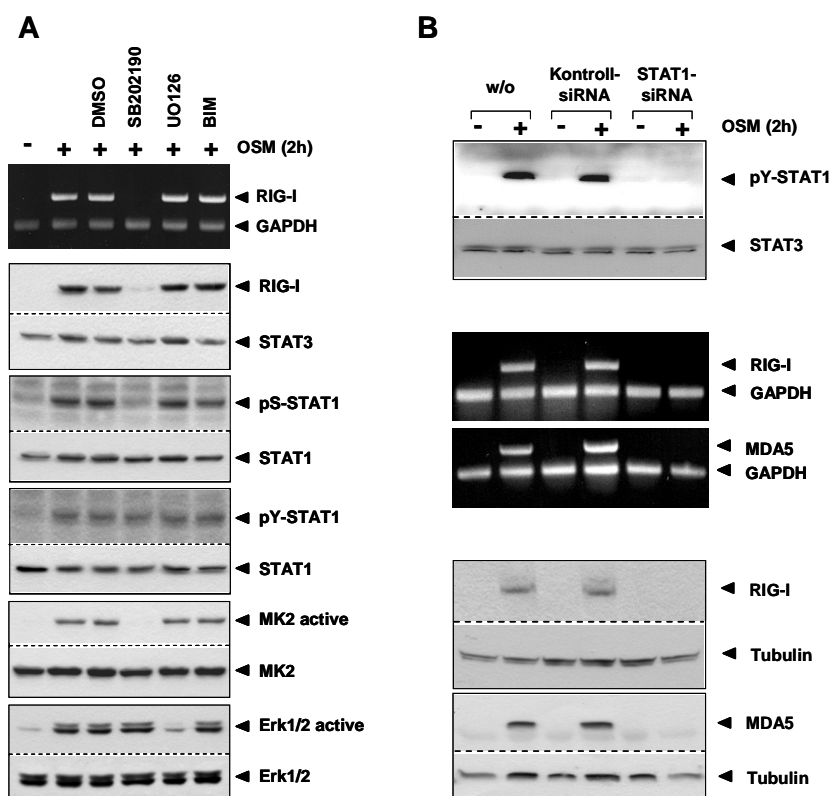


Abb.45: Die STAT1-Serinphosphorylierung wird über die Kinase p38 vermittelt und ermöglicht so die OSM-induzierte Expression von RIG-I

(A) HLFs wurden 30min mit 10 μ M SB202190, 10 μ M UO126 oder 500nM BIM behandelt und anschließend 2 h mit 20ng/ml stimuliert. Die RIG-I-mRNA-Spiegel wurden mittels RT-PCR bestimmt. Die Proteinspiegel der einzelnen Proteine wurden über Western Blots mit spezifischen Antisera gegen phospho-STAT1(Y₇₀₁), phospho-STAT1(S₇₂₇), phospho-ERK1/2 und phospho-MK2 detektiert. Nach erfolgtem *strippen* wurden die Membranen entsprechend gefärbt. **(B)** HLFs wurden mit STAT1-siRNA wie im Methodenabschnitt beschrieben transfiziert. 48 h nach der Transfektion konnten die Zellen 2 h mit 20ng/ml OSM stimuliert werden. Um die *knock-down*-Effizienz zu überprüfen wurden die entsprechenden Proteine aus Lysaten mit Antikörpern gegen STAT1, RIG-I und MDA5 nachgewiesen. Die mRNA-Spiegel von RIG-I und MDA5 wurden mit Hilfe von RT-PCRs ermittelt.

Um die Vermutung zu bestätigen, dass die Induktion von RIG-I von einer gleichzeitigen STAT1-Tyrosin- und Serinphosphorylierung abhängig ist, wurden HLFs mit LPS stimuliert (Abb.44B). Wie erwartet und bereits in früheren Studien gezeigt, führt die Stimulation von HLFs mit LPS zu einer schnellen STAT1-Serinphosphorylierung (Abb.44B; oberer Blot), die alleine aber nicht ausreicht, um die Produktion von RIG-I zu induzieren. Erst bei gleichzeitiger Serin- und Tyrosinphosphorylierung von STAT1 und damit knapp 3 h später ist die Expression von RIG-I möglich (Abb.44B; zweiter und dritter Blot). Um im Weiteren herauszufinden, welche Kinasen für die OSM-induzierte STAT1-Serinphosphorylierung verantwortlich sind, wurden HLFs mit den etablierten, pharmakologischen Inhibitoren gegen die Serin-/Threoninkinasen p38 (SB202190), MEK1 (U0126) und PKC (BIM) behandelt und anschließend mit OSM stimuliert. Abbildung 45A zeigt, dass die OSM-vermittelte STAT1-Serinphosphorylierung bzw. die induzierte RIG-I-Expression von einer möglichen p38-Aktivierung abhängen. ERK1/2 und die Proteinkinase C tragen nicht zur Expression der DExD/H-Box Helikase RIG-I bei.

Um nachhaltig die Bedeutung von STAT1 für die Expression der beiden Helikasen zu belegen, wurden die primären Fibroblasten mit STAT1 siRNA transfiziert und 48 h später mit OSM stimuliert. Wie Abbildung 45B zeigt, verhindert der effiziente STAT1-*knock-down* erwartungsgemäß die OSM-vermittelte Tyrosinphosphorylierung von STAT1 (obere Blots). Den zuvor beschriebenen Resultaten entsprechend lässt ein STAT1-*knock-down* eine Induktion der DExD/H-Box-Helikasen nicht zu (mittlere und untere Blots).

III.4.4 OSM sensibilisiert Fibroblasten für eine bevorstehende Behandlung mit poly(I:C)

Es ist die Aufgabe der RNA-Helikasen RIG-I und MDA5, im Zytoplasma vorhandene virale RNA zu detektieren. Um diesen Ablauf leichter untersuchen zu können und nicht zwangsläufig auf virale Infektionen angewiesen zu sein, ist es allgemein verbreitet, Zellen mit dem doppelsträngigem RNA-Analog poly(I:C) zu stimulieren bzw. zu transfizieren und so eine virale Infektion vorzutäuschen. Binden RIG-I und MDA5 an diese dsRNA-Fragmente, induzieren sie eine

Serinphosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF3, der seinerseits im weiteren Verlauf die Expression von Typ-I Interferonen ermöglicht.

Einleitende Experimente zeigen (Abb.46A und B), dass eine IRF3-Aktivierung in HLFs infolge einer zweistündigen Stimulation erst ab einer Dosis von mindestens 20µg/ml poly(I:C) erfolgt. Niedrigere Dosen poly(I:C) induzieren keine IRF3-Phosphorylierung. Beachtenswerterweise ist eine IRF3-Serinphosphorylierung aber bereits bei einer Stimulation mit 5µg/ml poly(I:C) möglich, wenn die humanen Lungenfibroblasten zuvor 2 h mit OSM oder 6 h mit IFN γ inkubiert worden sind (Abb.46C).

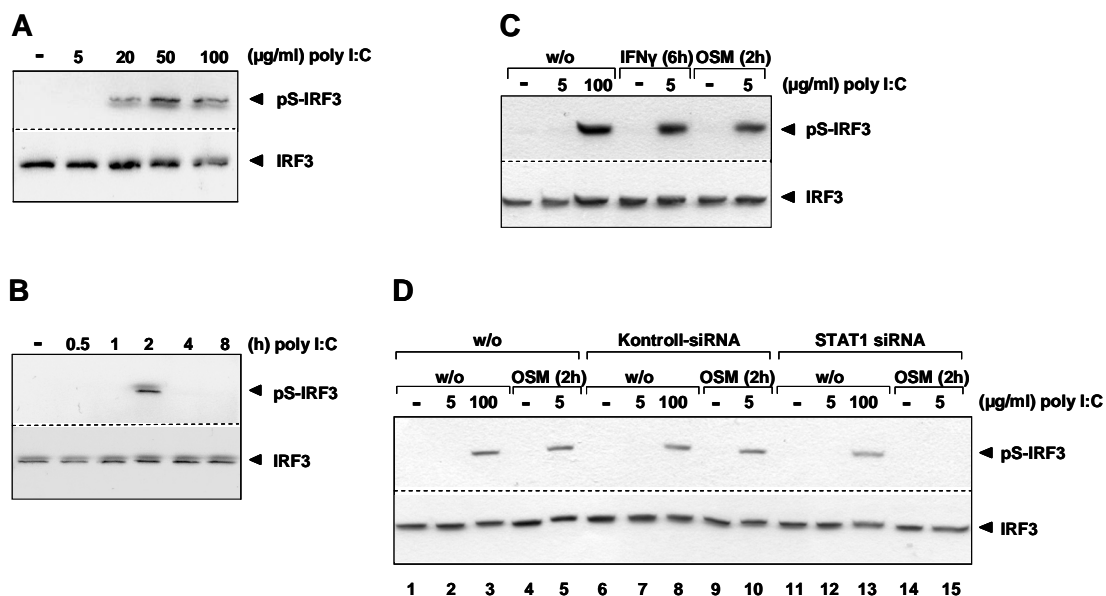


Abb.46: OSM sensibilisiert HLFs für eine bevorstehende Stimulation mit dem synthetischen dsRNA-Molekül poly(I:C)

(A) HLFs wurden 2 h mit ansteigenden Mengen poly(I:C) stimuliert. Die Spiegel von aktiviertem IRF3 wurden mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers aus Lysaten nachgewiesen. (B) HLFs wurden für die beschriebenen Zeiträume mit 50µg/ml poly(I:C) stimuliert. Die Auswertung der IRF3-Proteinspiegel erfolgte wie in (A) erläutert. (C) HLFs wurden 2 h mit 20ng/ml OSM oder 1000U/ml IFN γ vorinkubiert und dann 2 h mit 5 bzw. 100µg/ml poly(I:C) stimuliert. Die Detektion der aktivierten IRF3-Proteinspiegel erfolgte wie in (A) und (B) beschrieben. (D) HLFs wurden mit STAT1-siRNA wie im Methodenabschnitt beschrieben transfiziert. 48 h nach der Transfektion konnten die Zellen 2 h mit 20ng/ml OSM vorstimuliert und anschließend mit 5 bzw. 100µg/ml poly(I:C) behandelt werden. Auch in diesem Fall wurden die pS-IRF3-Proteinspiegel mittels Western Blot und angeschlossener Immundetektion bestimmt.

Um im Weiteren herauszufinden, ob die verstärkte Responsivität der Lungenfibroblasten auf poly(I:C) nach OSM-Vorinkubation auf eine OSM-

vermittelte Induktion der Helikasen RIG-I und MDA5 zurückgeht, sollte untersucht werden, ob sich die gesteigerte Responsivität auf poly(I:C) in STAT1-*knock-out*-Zellen wieder abschwächt. Wie Abbildung 46D verdeutlicht, lässt sich eine IRF3-Aktivierung infolge einer Stimulation mit 5µg/ml poly(I:C) und entsprechender OSM-Vorinkubation nur in untransfizierten und in siRNA-Kontrollzellen nachweisen (Abb.46D; Spuren 5 und 10). Die mit STAT1-siRNA transfizierten Zellen dagegen reagieren nur noch auf die Stimulation mit deutlich höheren Mengen poly(I:C) (100µg/ml) und reagieren auch nach einer OSM-Vorinkubation nicht mehr auf geringe poly(I:C)-Dosen (Abb.46D; Spuren 13 und 15).

III.4.5 Eine Präinkubation mit OSM ermöglicht die IFN β -Sekretion auch infolge einer eigentlich ineffizienten poly(I:C)-Stimulation

Die Gegenwart freier doppelsträngiger RNA im Zytoplasma einer Zelle ist ein klassischer Indikator für eine virale Infektion. Die darin begründete physiologische Antwort einer solchen Zelle ist die Freisetzung von Typ-I Interferonen. Da mit OSM vorbehandelte HLFs auch auf niedrige poly(I:C)-Konzentrationen mit einer IRF3-Aktivierung antworten, sollte im Folgenden geklärt werden, ob die sensibilisierten Lungenfibroblasten infolge einer suboptimalen poly(I:C)-Stimulation IFN β sezernieren und somit dem *priming*-Effekt eine physiologische Bedeutung zukommt.

Tatsächlich lässt ein entsprechender Versuchsansatz mit einer einstündigen OSM-Vorinkubation eine signifikant gesteigerte IFN β -Transkription als Antwort auf eine Stimulation mit 5µg/ml poly(I:C) erkennen (Abb.47A und B). Eine verlängerte OSM-Präinkubation bis hin zu 18 h hat dabei keinen verstärkenden Einfluss auf die IFN β -Transkriptionsrate. Dies steht im Gegensatz zum IFN γ -vermittelten *priming*-Effekt infolge einer poly(I:C)-Stimulation. Während eine einstündige IFN γ -Präinkubation die IFN β -Transkription 3-4fach hochreguliert, wird sie nach 18stündiger IFN γ -Vorbehandlung gleich 20fach verstärkt. Abbildung 47C belegt, dass sich die durch OSM-Präinkubation verstärkte IFN β -Transkriptionsrate letztlich auch in substantiellen IFN β -Proteinmengen im Zellüberstand widerspiegelt. Dabei ist hervorzuheben, dass mit OSM vorbehandelte

Lungenfibroblasten infolge einer Stimulation mit 5µg/ml poly(I:C) vergleichbare IFNβ-Mengen produzieren wie Fibroblasten, die allein mit 100µg/ml poly(I:C) inkubiert werden (Abb.47C, vergleiche Säule 3 mit Säule 5).

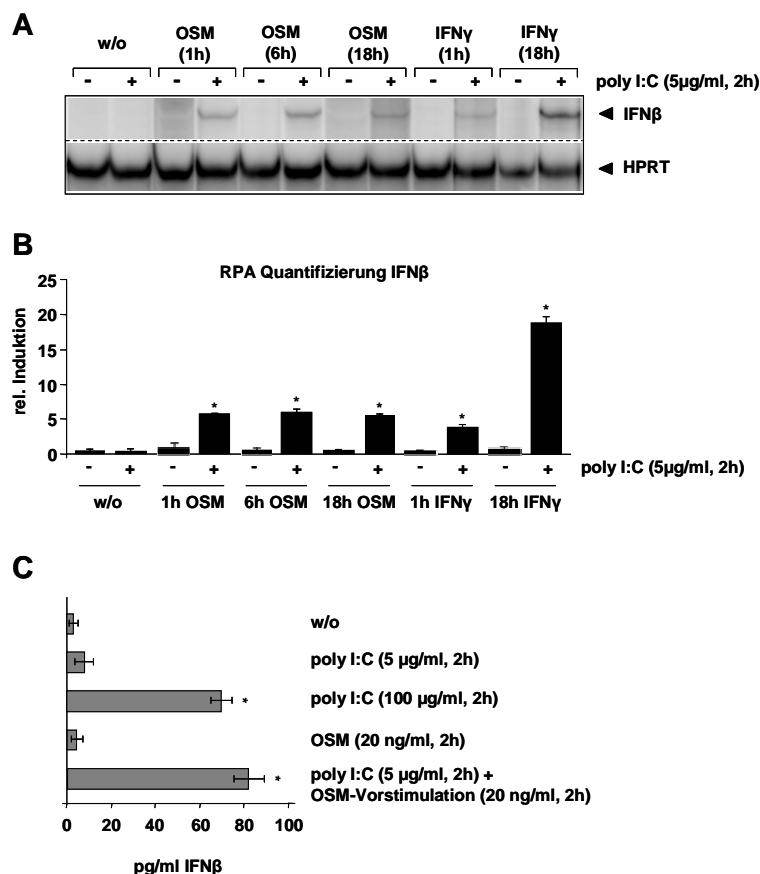


Abb.47: Eine OSM-Präinkubation ermöglicht die IFNβ-Produktion infolge geringer poly(I:C)-Konzentrationen

(A) HLFs wurden 2 h mit 20ng/ml OSM oder 1000U/ml IFN γ vorbehandelt und dann 2 h mit 5µg/ml poly(I:C) stimuliert. Die IFN β -mRNA-Spiegel wurden mittels RPA bestimmt. Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ist abgebildet. (B) Die RPA-Resultate wurden mit Hilfe eines *Phosphoimager* quantifiziert. Die erhaltenen Werte für IFN β wurden gegen die entsprechenden HPRT-Werte normalisiert und als relative Induktion zum Wert der unstimulierten Proben aufgetragen. Werte \pm S.D. (n = 3). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert. (C) HDFs wurden 2 h wie angegeben stimuliert. Die IFN β -Proteinmengen im Zellüberstand wurden mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Werte \pm S.D. (n = 9; fünf verschiedene Spender). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert.

III.4.6 Das M-Protein des *vesicular stomatitis virus* verhindert die OSM-induzierte Expression der DExD/H-Box Helikasen

Die physiologische Relevanz der DExD/H-Box Helikasen wird durch vielzählige Literaturhinweise gestützt, in denen aufgezeigt wird, dass diverse Viren verschiedenartigste Schutzmechanismen entwickelt haben, um der Detektion durch die Helikasen zu entgehen.

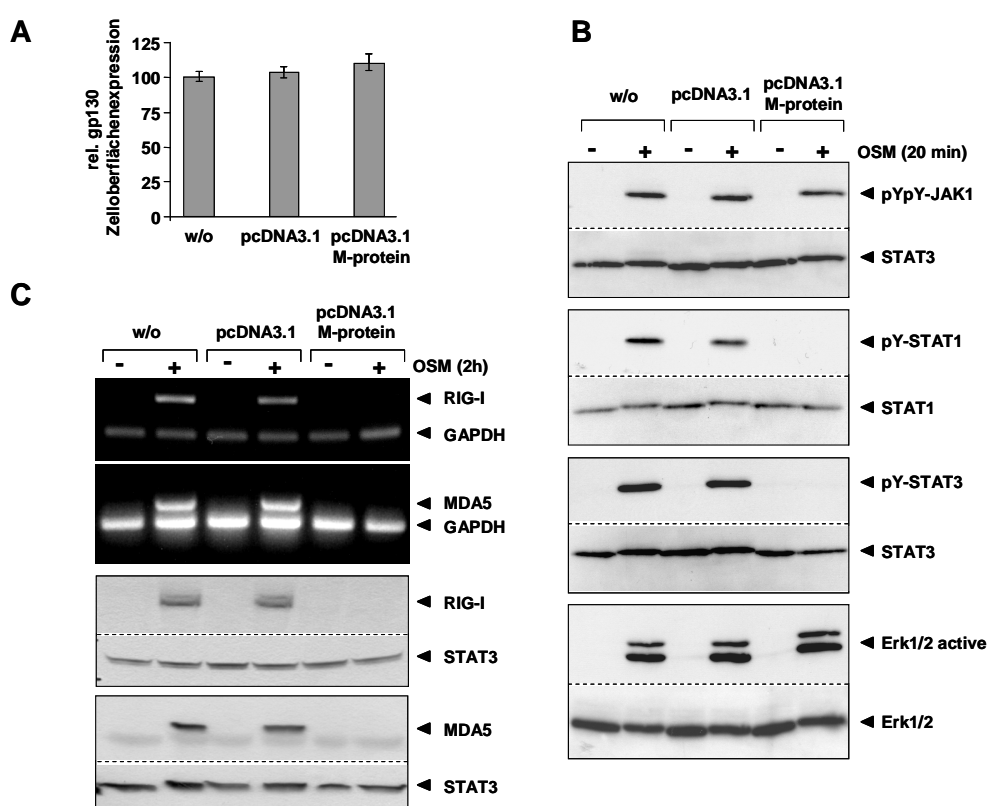


Abb.48: Das VSV M-Protein blockiert die OSM-induzierte RIG-I-Expression

(A) HLFs wurden mit den beschriebenen Plasmiden transfiziert. Die Oberflächenexpression von gp130 wurde mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen die Extrazellulärregion von gp130 durch FACS-Analyse bestimmt. Das Balkendiagramm repräsentiert die aufgearbeiteten FACS-Daten. Die Hintergrundfluoreszenz wurde verrechnet und der Wert aller untransfizierten Zellen als 100 definiert. Mediane und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen sind zusammengefasst. (B) HLFs wurden wie in (A) beschrieben transfiziert und dann 20 min mit 20ng/ml OSM stimuliert. Die Lysate wurden über Western Blots und anschließende Immundetektionen mit entsprechenden Antikörpern aufgearbeitet. (C) HLFs wurden wie oben beschrieben transfiziert und 2 h mit 20ng/ml OSM stimuliert. Lysate und RNAs wurden präpariert und die mRNA-Spiegel bzw. Proteinspiegel mittels RT-PCR bzw. Western Blot Analyse bestimmt.

Ein Beispiel ist das Matrixprotein des VSV, das in die zelluläre Transkription eingreifen und so die Produktion von IFN β trotz akuter viraler Infektion unterbinden

kann. Darüberhinaus ist bekannt, dass das M-Protein eine mögliche STAT-Aktivierung infolge einer Zytokinstimulation unterbinden kann (159).

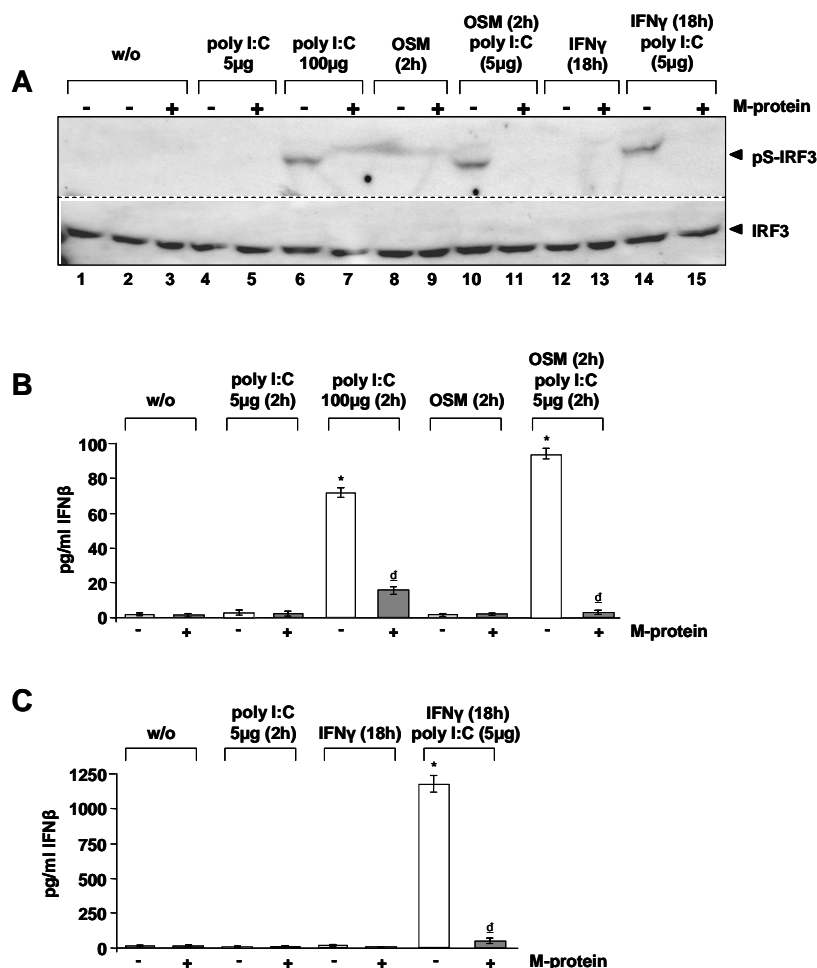


Abb.49: Das VSV M-Protein unterbindet die Sekretion von IFNβ

(A) HLFs wurden wiederum mit dem VSV M-Protein transfiziert, gegebenenfalls 2 h mit 20ng/ml OSM oder 18 h mit 1000U/ml IFNγ vorbehandelt und abschließend mit 5 oder 100µg/ml poly(I:C) stimuliert. Phospho-IRF3 und IRF3 wurden mit spezifischen Antikörpern aus Gesamtzelllysaten nachgewiesen. (B) und (C) HDFs wurden wie in (A) beschrieben transfiziert und stimuliert. Die IFNβ-Proteinmengen im Zellüberstand wurden mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Werte ± S.D. (n = 3). * = p < 0.05 gegen den Kontrollwert; d = p < 0.05 gegen die untransfizierte Probe desselben Stimulationsansatzes.

Aus diesem Grund sollte im letzten Teilabschnitt dieses Projektes untersucht werden, ob das M-Protein möglicherweise auch den OSM-vermittelten *priming*-Effekt verhindern kann, indem es beispielsweise die Expression von RIG-I oder MDA5 unterdrückt. Folglich wurden Lungenfibroblasten mit Expressionsplasmiden transfiziert, die für das VSV-M-Protein kodieren.

Die Expression des M-Proteins in HLFs hat keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von gp130 (Abb.48A), unterbindet aber interessanterweise die OSM-abhängige Aktivierung von STAT1 und STAT3, während JAK1 und ERK1/2 völlig normal phosphoryliert werden können (Abb.48B). Aufgrund der unterbundenen STAT1-Phosphorylierung ist keine Expression von RIG-I oder MDA5 erkennbar (Abb.48C) und infolge dessen ist auch keine IRF3-Serinphosphorylierung nach Stimulation mit 5µg/ml poly(I:C) detektierbar, obwohl eine entsprechende OSM-Präinkubation erfolgte (Abb.49A; Spur 11). Interessanterweise hemmt das M-Protein die Phosphorylierung von IRF3 unabhängig vom ursprünglichen Aktivierungsweg. Sowohl die durch hohe Dosen poly(I:C) induzierte IRF3-Phosphorylierung, als auch die durch niedrige Dosen und entsprechende Präinkubation mit OSM oder IFN γ ermöglichte Aktivierung wird blockiert (Abb.49A; Spuren 7, 11 und 15). Die in Abb.49B und C aufgezeigten Resultate stehen im Einklang zu den soeben beschriebenen Erkenntnissen. IFN β ist nur dann im Zellüberstand nachweisbar, wenn zuvor eine IRF3-Aktivierung detektierbar ist. Wird letztere folgerichtig durch das Wirken des M-Proteins unterdrückt, kann die Zelle letztlich auch kein IFN β mehr sezernieren.

IV. Diskussion

IV.1 Molekulare Mechanismen der OSM-vermittelten STAT1-, STAT3- und STAT5-Aktivierung

Auch wenn die ersten Publikationen über den JAK/STAT-Signalweg mehr als 15 Jahre zurückliegen, sind die molekularen Mechanismen, die zur Rekrutierung von Janus Kinasen an den OSMR führen, immer noch nicht geklärt. Ebenso lückenhaft ist das Wissen darüber, wie genau die JAKs aktiviert werden und welchen Beitrag sie letztlich zur Aktivierung der STAT-Faktoren leisten. Zweifellos weiß man, dass die hoch konservierte prolinreiche Region der Box1-Region des OSMR, sowie die FERM-Domäne der JAKs essentiell für eine JAK/Rezeptor-Interaktion sind, auf welche Weise aber die Spezifität einer jeden Reaktion erreicht wird, ist völlig unklar. Bislang sind auch keine Daten veröffentlicht, die Aussagen über die Struktur von JAK-assoziierten Zytokinrezeptoren oder die JAKs an sich machen und damit dazu beitragen könnten, Genaueres über die tatsächlichen Interaktionen zwischen Janus Kinasen und Rezeptoren und damit letztlich auch über die Aktivierung einzelner STAT-Faktoren zu erfahren.

IV.1.1 Evolutionär diverse Mechanismen führen zur OSM-induzierten STAT5-Phosphorylierung

Der humane und murine OSM-Rezeptor unterscheiden sich insbesondere hinsichtlich der Nutzung verschiedener Rezeptorkomplexe. Während humanes OSM sowohl über den Typ-I-Rezeptorkomplex (gp130/LIFR), als auch über den Typ-II-Rezeptorkomplex (gp130/OSMR) signalisiert, ist die über murines OSM induzierte Signalkaskade allein vom Typ-II-Rezeptorkomplex abhängig (27,28). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der humane und der murine OSMR verschiedene Mechanismen nutzen, um STAT5 zu phosphorylieren, während STAT1 und STAT3 über konservierte Mechanismen aktiviert werden.

IV.1.1.1 Die OSM-vermittelte STAT5-Aktivierung ist OSMR-abhängig

Basierend auf den Tatsachen, dass murines OSM STAT5 in murinen Fibroblasten aktiviert (Abb.10A) und dass der spezifische LIF-Inhibitor LIF-05 nur die LIF-induzierte, nicht aber die OSM-induzierte STAT5-Phosphorylierung blockiert, (Abb.6B) kann geschlossen werden, dass die OSM-induzierte STAT5-Aktivierung über den Typ-II-Rezeptorkomplex vermittelt wird. Diese Hypothese wird zusätzlich dadurch bestätigt, dass die humane Melanomzelllinie A375 nur den Typ-II-Rezeptorkomplex exprimiert und somit fähig ist, STAT5 zu aktivieren (persönliche Mitteilung, C. Evers). Darüberhinaus zeigt eine bereits veröffentlichte Studie, dass homodimerisierte GCSF-R/OSMR-Chimären die Fähigkeit besitzen, STAT5 zu phosphorylieren (68).

IV.1.1.2 Das Doppelyrosinmotiv Y₈₃₇LY₈₃₉L im humanen OSMR rekrutiert STAT5

In dieser Arbeit konnte das Doppelyrosinmotiv Y₈₃₇/Y₈₃₉ innerhalb des humanen OSMR als Rekrutierungsstelle für STAT5 identifiziert werden. Diese Tyrosine sind im Aminosäuremotiv PNYLYLLP lokalisiert, das im Einklang mit dem bekannten STAT5-Aktivierungsmotiv DXpYΦXΦ steht, dass bereits von May *et al.* beschrieben wurde (160). Ein Unterschied zwischen beiden Sequenzen besteht lediglich in der N-terminal zum Tyrosinrest gelegenen sauren Aminosäure. Auch anderen bekannten Rezeptorsystemen wie dem Rezeptor des Wachstumshormons (161-163), dem Erythropoetinrezeptor (164-166) und der Interleukin-2-Rezeptor-β-Kette (167) liegt eine tyrosinbasierende STAT5-Rekrutierung zu Grunde. Ganz besonders auffällig ist dabei die bemerkenswerte Ähnlichkeit des STAT5-Bindemotivs LKYLYLVVS vom EPOR zum hier beschriebenen STAT5-Rekrutierungsmotiv innerhalb des humanen OSMR (168). Interessanterweise ist dieses Rekrutierungsmotiv nicht zwischen der humanen und murinen Spezies konserviert. Es findet sich aber in den OSMR-Sequenzen von Schimpansen, Rhesus-Affen, Kühen, Pferden und Kaninchen, nicht aber in denen von Ratten und Mäusen. Das Fehlen dieser Sequenz beruht aber nicht auf einer Mutation, sondern auf einer präzisen Deletion der drei für den humanen Rezeptor bedeutungsvollen drei Aminosäuren Y₈₃₇LY₈₃₉ (Abb.50). Die Deletion dieser

Aminosäuren könnte auch der Grund dafür sein, dass frühere Studien scheiterten, in denen man versuchte, die molekularen Mechanismen der OSM-vermittelten STAT5-Aktivierung zu erforschen. In der Arbeit von Kuropatwinski *et al.* wurden nämlich ausschließlich Tyrosinmotive untersucht, die zwischen dem humanen und murinen OSMR konserviert sind.

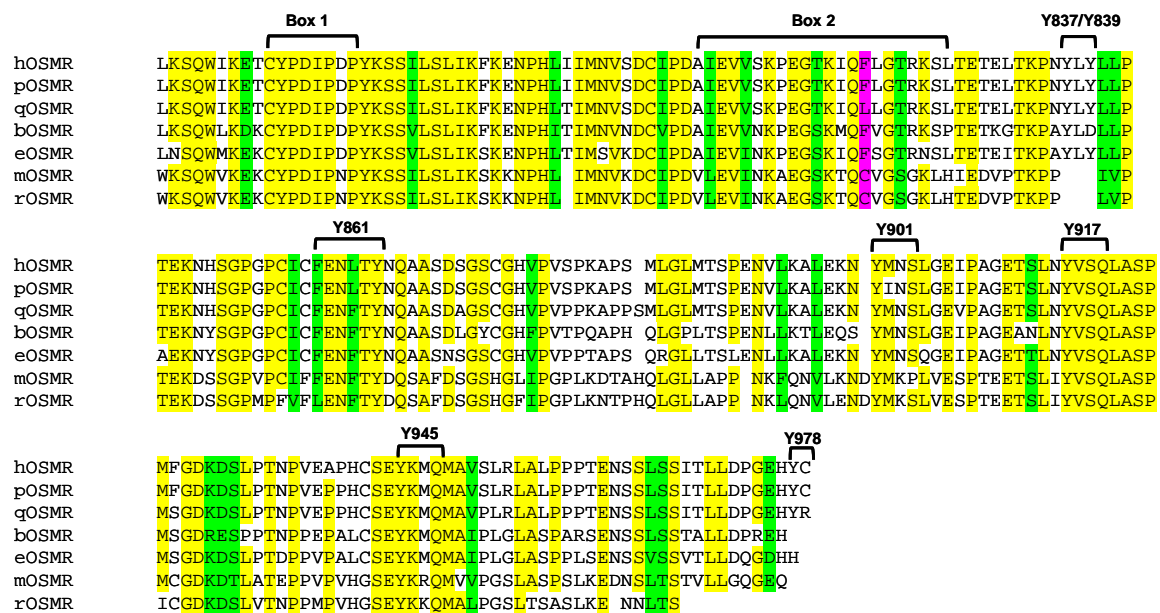


Abb.50: Gegenüberstellung von OSMR-Sequenzen diverser Spezies

Die Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies sind gegenübergestellt (h, Mensch; p, Schimpanse; q, Rhesus-Affe; b, Kuh; e, Pferd; m, Maus; r, Ratte). Sowohl die Box1- und die Box2-Region, als auch die Tyrosinmotive sind gekennzeichnet. Hoch konservierte Aminosäurereste, die in mindestens 6 von 7 Spezies vorhanden sind, sind gelb unterlegt. Grün gekennzeichnet sind nicht konservierte Aminosäuren, die aber entsprechende chemische Eigenschaften aufweisen. Die magenta gefärbten Aminosäuren sind für das JAK-Bindeprofil der OSMRs von Bedeutung.

IV.1.1.3 Eine präferenzielle Rekrutierung von JAK2 führt im murinen System zur STAT5-Phosphorylierung

Im Gegensatz zum humanen Rezeptor ist eine verkürzte Form des murinen OSMR, die nur noch die JAK-rekrutierende Box1/2-Region enthält, befähigt, eine deutliche STAT5-Aktivierung zu induzieren (Abb.10C). Daraus lässt sich schließen, dass die STAT5-Phosphorylierung über den murinen OSMR direkt über die Janus Kinasen vermittelt wird. Beim Vergleich des JAK-Aktivierungsprofils des

humanen und des murinen OSMR fällt bei genauerer Betrachtung deutlich ins Auge, dass der humane OSMR präferentiell JAK1 aktiviert und nur eine schwache JAK2-Phosphorylierung zu detektieren ist. Im Gegensatz dazu aktiviert der murine OSMR/gp130-Rezeptorkomplex deutlich besser JAK2 (Abb.12). Da bereits frühere Studien Hinweise auf direkte Interaktionen zwischen JAK2 und STAT5 gaben, stellte sich im Folgenden die Frage, ob sich humaner und muriner OSMR in ihren Präferenzen, JAK2 zu rekrutieren, unterscheiden. Und tatsächlich lässt sich endogenes JAK2 über ein die murine Box1/2-Region enthaltendes, chimäres Rezeptorkonstrukt immunpräzipitieren, während dies über ein entsprechendes humanes Konstrukt nicht möglich ist (Abb.13A). Es ist jedoch zu beachten, dass sich überexprimiertes JAK2 zweifellos über den humanen OSMR kopräzipitieren lässt (54) und somit befähigt ist, die Oberflächenexpression des humanen OSMR positiv zu beeinflussen (61). Die Gesamtheit der hier erhaltenen und bereits publizierten Ergebnisse deuten also mehr auf eine niedrige Affinität zwischen JAK2 und dem humanen OSMR hin, als dass sie die Unmöglichkeit einer Interaktion zwischen humanem OSMR und JAK2 belegen.

Studien, die die Mutagenese der Box1/2-Region betreffen, belegen nachdrücklich, dass die murine Box2 von entscheidender Bedeutung für eine tyrosinunabhängige STAT5-Aktivierung über den murinen OSMR ist (Abb.11B). Darüberhinaus ist die Punktmutation F₈₂₀C in der humanen Box2 hinreichend, um auch über den humanen Rezeptor STAT5 direkt über die Janus Kinasen zu aktivieren. Mit Blick auf die Beobachtung, dass der murine Rezeptor präferentiell JAK2 aktiviert, lag die Vermutung nahe, dass die Aminosäure Phenylalanin F₈₂₀ im humanen Rezeptor eine effiziente Rekrutierung von JAK2 an den humanen Rezeptor verhindert. Der Hypothese entsprechend ermöglicht die Mutation des beschriebenen Phenylalanins in die entsprechende Aminosäure des murinen OSMR (Cystein) eine effiziente Rekrutierung von JAK2 an den humanen OSMR (Abb.11C).

IV.1.1.4 JAK2 und STAT5 können direkt interagieren

Im Weiteren zeigen Resultate dieser Arbeit, dass STAT5 und JAK2, nicht aber STAT5 und JAK1 nach Stimulation des murinen OSMR direkt interagieren können

(Abb.13B). Ein erster Hinweis, dass STAT5 direkt an Janus Kinasen binden kann, resultiert aus den Ergebnissen eines *yeast two-hybrid* Screens, in dem STAT5 als potentieller Bindungspartner der JAK-Kinase-*like*-Domänen (KLD) identifiziert werden konnte (145). Von größerer Wichtigkeit ist allerdings die Kenntnis über die Fusion der JAK2-Kinasedomäne (KD) mit der N-terminalen Domäne des Transkriptionsfaktor TEL, die letztlich zur STAT5-Aktivierung führt (169). Die genetische TEL/JAK2-Fusion ist das Resultat einer chromosomalen Translokation und der Ursprung von diversen, den Menschen betreffenden Leukämien (170,171). In einem weiteren Beispiel bewirkt eine artifizielle Substitution der intrazellulären Region des EGF-Rezeptors durch die JAK2-Kinasedomäne eine ligandeninduzierte Tyrosinphosphorylierung von STAT5 (172). STAT5 kann also sowohl mit der Kinase-*like*-Domäne (145), als auch mit der Kinasedomäne (169,172) von JAK2 interagieren. Dies begründet sich in vergleichbaren Strukturvorhersagen für die KD und KLD von JAK2, die sich beide nur durch den Austausch von katalytisch, nicht aber strukturell wichtigen Aminosäuren unterscheiden.

Die hier erhaltenen Daten unterstützen allerdings keine direkte Interaktion zwischen STAT5 und JAK2 innerhalb der über den humanen OSMR-vermittelten Signaltransduktion. Weder das β /OSMR YFFFFFF Ost1- (Abb.8), noch das β /OSMR Box1/2-Konstrukt (Abb.10) vermitteln eine direkte STAT5-Phosphorylierung über die Janus Kinasen. Dennoch ist auch im humanen System eine unterstützende Rolle von JAK2 für die OSMR-vermittelte Signaltransduktion ersichtlich. Im Vergleich zu den parentalen Fibrosarkomzellen ist die STAT5-Aktivierung in JAK2-defizienten Zellen deutlich reduziert (Abb.14A). Dies gilt auch für Fibrosarkomzellen, die mit dem JAK2-Inhibitor AG490 vorbehandelt wurden (Daten nicht gezeigt).

IV.1.1.5 JAK1 übernimmt im humanen System die Rolle einer Initiator kinase

Wie in früheren Studien bereits für IL-6 beschrieben (64), so scheint JAK1 in humanen Zellen auch nach einem OSM-Stimulus eine besondere Bedeutung für die Aktivierung von STAT-Faktoren zu besitzen. So kann man in JAK1-defizienten

Fibrosarkomzellen (U4C) nur eine sehr reduzierte STAT3-Phosphorylierung und keine STAT1- bzw. STAT5-Aktivierung mehr detektieren (Abb.14).

Aus diesem Grund lässt sich postulieren, dass im humanen System sowohl gp130, als auch der OSMR präferentiell JAK1 binden und aktivieren. Dennoch spielt JAK2 eine wichtige, unterstützende Rolle bei der Aktivierung von STAT3 bzw. STAT5 und wird dazu über JAK1, das hier die Funktion einer Initiator kinase übernimmt, an den OSMR rekrutiert. Im Falle des murinen Rezeptorsystems dagegen unterliegt die Rekrutierung von JAK1 dem murinen gp130, während der OSMR wie beschrieben präferentiell JAK2 bindet, um so STAT5 direkt zu phosphorylieren.

IV.1.2 STAT1 und STAT3 werden durch evolutionär konservierte Mechanismen phosphoryliert

Die evolutionär diversen Mechanismen, die im humanen und murinen System zur Aktivierung von STAT5 führen, sind in der OSMR-vermittelten Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 nicht zu beobachten.

IV.1.2.1 Die tyrosinunabhängige Phosphorylierung von STAT1 wird insbesondere durch JAK1 vermittelt

Mit Hilfe von Phosphopeptiden wurde auch für STAT1 bereits vor einigen Jahren ein charakteristisches Bindemotiv beschrieben. So bindet STAT1 vor allem Peptide, die ein Y-(D/E)-(P/R)-(R/P/Q)-Motiv enthalten (63). Doch obwohl OSM die Phosphorylierung von STAT1 induziert, beinhaltet der OSMR kein entsprechendes Bindemotiv. Die in Abbildung 7B dargestellten Resultate stehen im Einklang zu diesen Erkenntnissen. Sowohl STAT1, als auch das STAT1-Zielgen IRF1 werden tyrosinunabhängig direkt über die OSMR-assoziierten Janus Kinasen aktiviert bzw. induziert. Entsprechend sind auch die verkürzten Versionen des humanen bzw. murinen OSMR, die nur die Box1/2-Region des jeweiligen Rezeptors enthalten, befähigt, STAT1 zu phosphorylieren (Abb.10C). Diese Ergebnisse werden durch die Arbeit von Kuropatwinski *et al.* belegt (68), die zeigen, dass eine über chimäre G-CSF/OSMR-Konstrukte induzierte STAT1-Phosphorylierung nur durch Deletion der Box1/2-Region unterbunden werden kann. Die Stimulation

JAK1-defizienter Fibrosarkomzellen hebt die zentrale Rolle von JAK1 für die OSM-induzierte STAT1-Aktivierung hervor. Darüberhinaus stehen diese Resultate im Einklang mit den von Gupta *et al.* publizierten Daten, die eine direkte Interaktion von STAT1 mit der SH2-Domäne von JAK1 in einem GST-pull-down-assay aufzeigen (173).

IV.1.2.2 STAT3 wird tyrosinabhängig aktiviert

Wie vorhergesagt, wird die OSM-induzierte STAT3-Phosphorylierung über die beiden Tyrosinmotive Y₉₁₇ (YVSQ) und Y₉₄₅ (YKMQ) vermittelt (Abb.7A), die in allen bis heute analysierten Spezies konserviert sind (Abb.50). Beide Motive entsprechen dem allgemein akzeptierten STAT3-Rekrutierungsmotiv YXXQ (55,63). Die erhaltenen Ergebnisse stehen im Einklang zu den publizierten Ergebnissen von Kuropatwinski *et al.*, die zeigen, dass ein verkürzter OSMR, der nur noch die 142 membran-proximal-gelegenen Aminosäuren und somit nicht mehr die Tyrosine Y₉₁₇ und Y₉₄₅ enthält, die Fähigkeit, STAT3 zu phosphorylieren, verliert (68). Interessanterweise führt die OSM-Stimulation von JAK1-defizienten Fibrosarkomzellen immer noch zu einer schwachen STAT3-Aktivierung (Abb.14A). Zieht man dabei zusätzlich in Betracht, dass in JAK1-defizienten Zellen die Oberflächenexpression von gp130 und dem OSMR signifikant reduziert ist (persönliche Mitteilung, Dr. S. Radtke), so ist der verbleibende Spiegel von aktiviertem STAT3 bemerkenswert. Vergleichbare Resultate erbrachten Studien von Haan *et al.* (174), in denen JAK1-defiziente Fibrosarkomzellen mit einer kinaseinaktiven Mutante von JAK1 rekonstituiert wurden und dennoch zur OSM-induzierten STAT3-Phosphorylierung befähigt sind.

IV.2 Eine OSM-vermittelte, konstitutive Aktivierung des JAK2/STAT5/CIS-Signalwegs unterbindet die Synthese und Sekretion des Chemokins CCL1

Eine angemessene Immunantwort auf entsprechende Gegebenheiten hängt in besonderem Maße von der Interaktion diverser Zelltypen ab, welche unter anderem durch direkten Zellkontakt oder lösliche Faktoren gesteuert wird. Bei

Gewebsverletzungen oder nach dem Eindringen von Pathogenen stellt die Rekrutierung von Leukozyten einen initialen Schritt einer Immunantwort dar. Oftmals wird dieser Rekrutierungsprozess von Mitgliedern der Chemokin-Superfamilie, im Besonderen von den induzierbaren „inflammatorischen Chemokinen“, übernommen (97,175,176). Mittlerweile zählt man mehr als 50 dieser nicht konstitutiv exprimierten Chemokine, zu denen auch die Familie der „*monocyte-chemoattractant proteins*“ (CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2 und CCL13/MCP-4) gehört. Ihre biologischen Effekte vermitteln die MCP-Proteine durch die Bindung an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CCR1 und CCR2, die auf der Oberfläche diverser Zelltypen exprimiert werden (97,176). Ein weiteres proinflammatorisches Chemokin, das als CCL1/I-309 beschrieben wurde und von aktivierten T-Zellen exprimiert wird (177), signalisiert über den Chemokinrezeptor CCR8. Dieser ist insbesondere auf der Zelloberfläche von polarisierten T_H2-Zellen, regulatorischen T-Zellen oder Makrophagen zu finden (178-181).

IV.2.1 Die OSM-induzierte Expression von inflammatorischen Chemokinen ist physiologisch relevant

Die im zweiten Teil dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse demonstrieren erstmalig, dass Oncostatin M die Expression von CCL1, CCL7 und CCL8 vermittelt (Abb.15). Sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene werden in dermalen Fibroblasten zu den bis hierher stärksten bekannten Aktivatoren dieser Chemokine (IL-1 β und TNF α) äquivalente Mengen induziert (Abb.16). Im Vergleich zu diesen bereits intensiv erforschten proinflammatorischen Zytokinen bewirkt OSM in HDFs eine signifikant schnellere Expression der untersuchten Chemokine (Abb.17). Die für Monozyten und T-Lymphozyten durchgeführten Migrationsassays unterstreichen die physiologische Relevanz und die Effizienz der OSM-vermittelten CCL1- und CCL8-Expression (Abb.18). Weitere Hinweise auf die tatsächliche Bedeutung OSM-induzierter Chemokine geben bereits frühere Publikationen. So ist zum Beispiel die OSM-vermittelte Sekretion von Eotaxin wichtig für die Rekrutierung von Eosinophilen (112). Eine gesteigerte Produktion von CCL21 in lymphatischen Endothelzellen unterstützt dagegen die Migration dendritischer Zellen in die angrenzenden Lymphknoten (182).

IV.2.2 Induktive und repressive Signalwege steuern die OSM-vermittelte Chemokinexpression

Um die Rolle von OSM in entzündlichen Prozessen genauer zu verstehen, ist es wichtig, die intrazellulären Mechanismen aufzuklären, die letztlich zur Freisetzung von CCL1, CCL7 und CCL8 führen. Dabei ist es erforderlich, die signalisierenden Rezeptorkomplexe und die nachgeschalteten Signalwege im Detail zu verstehen.

IV.2.2.1 Aktiviertes p38 garantiert die Stabilisierung der Chemokin-mRNAs

Interessanterweise kann der nächste Verwandte von OSM, der *leukemia inhibitory factor* (LIF), weder CCL1 noch CCL8 induzieren (Abb.16). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die OSM-vermittelte Expression von CCL1, CCL7 und CCL8 über den OSMR/gp130 Rezeptorkomplex und nicht über den LIFR/gp130 Rezeptorkomplex, über den auch LIF signalisiert, induziert wird.

Bereits frühere Studien haben gezeigt, dass OSM zur Induktion der Chemokine CCL2, Eotaxin (CCL11) oder SDF-1 (CXCL12) den JAK/STAT- bzw. den MAPK-Signalweg nutzt (112,113,129,182). Durch Einsatz von pharmakologischen Inhibitoren und siRNAs verdeutlichen dies auch die Resultate im zweiten Teil dieser Arbeit erstmalig für die OSM-abhängige Transkription der Chemokine CCL1, CCL7 und CCL8. So hat zwar die MAP-Kinase JNK keinen Einfluss auf die OSM-induzierte Expression von CCL1 und CCL8, die Aktivität von p38 und ERK1/2 aber ist für die Chemokininduktion unverzichtbar (Abb.19). Eine genauere Untersuchung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen hat ergeben, dass die MAPK p38 durch Phosphorylierung des Proteins Tristetraprolin (TTP) Einfluss auf die mRNA-Stabilität von CCL1, CCL7 und CCL8 nimmt (Abb.20 und 21). Bei TTP handelt es sich dabei um ein mRNA-destabilisierendes Protein, dass die mRNA-Degradation diverser proinflammatorischer Mediatoren durch Bindung an AU-reiche Elemente vermittelt. Die p38-vermittelte Phosphorylierung führt zur Degradation von TTP (183,184).

IV.2.2.2 Die MAP-Kinasen ERK1/2 ermöglichen eine verstärkte Transkription von CCL1, CCL7 und CCL8

ERK1/2 sind im Gegensatz zu p38 durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktorkomplexes AP-1 offensichtlich direkt an der verstärkten Transkription der untersuchten Chemokine beteiligt. AP-1 setzt sich aus den Faktoren c-Fos und c-Jun zusammen. Der *knock-down* von c-Fos und c-Jun reduziert effizient die Expression von CCL1 und CCL8 (Abb.22). Ein ähnliches Ergebnis ist kürzlich auch für die Induktion von CCL2 beschrieben worden (113). Eine alleinige Aktivität von ERK1/2 ist aber bemerkenswerterweise keineswegs ausreichend, um die Expression der Chemokine zu induzieren. Diese ist letztlich nur durch die Kombination von aktiviertem ERK1/2 und aktiviertem p38 möglich. Damit erklärt sich auch weshalb IL-6, ebenfalls als sehr potenter Aktivator von ERK1/2, nicht aber von p38 in HDFs beschrieben (81), nicht befähigt ist, eine verstärkte Chemokinexpression zu induzieren. Die Tatsache, dass weder der *knock-down* von STAT1, noch der von STAT3 oder STAT5 die CCL8-Expression beeinflussen, legt eine STAT-unabhängige Transkription nach OSM-Stimulation nahe und unterstreicht noch einmal die hervorstechende Bedeutung der MAPKs für die OSM-induzierte Chemokinexpression (Abb.23).

IV.2.2.3 STAT5 übt einen repressiven Effekt auf die OSM-induzierte CCL1-Expression aus

Wie bereits gerade für CCL8 diskutiert, hat der *knock-down* von STAT1 und STAT3 auch für die Sekretion von CCL1 keine Konsequenzen (Abb.23). Ein reprimierender Effekt von OSM-aktiviertem STAT5 wird dagegen gleich durch mehrere Experimente verdeutlicht. Erstens steigt die CCL1-Expression in mit STAT5-siRNA transfizierten HDFs sprunghaft an (Abb.23). Zweitens ist in STAT5-defizienten Mäusen eine verlängerte Transkription und verstärkte Sekretion von TCA-3, dem murinen Homolog von CCL1, messbar (Abb.24) und drittens führt die Inkubation von HDFs mit dem JAK2-Inhibitor AG490 zu einer signifikant verstärkten CCL1-Expression. Die Bedeutung von JAK2 für eine anschließende STAT5-Tyrosinphosphorylierung wurde bereits in früheren Publikationen und im ersten Teil dieser Arbeit belegt (144,145).

IV.2.3 Die JAK2-Mutation V₆₁₇F zieht die Suppression von CCL1 nach sich

Interessanterweise kann aktiviertes STAT3 die Expression von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in Krebszellen unterdrücken und somit das Immunsystem von einem effektiven Kampf gegen den Tumor abhalten (185). Da auch konstitutiv aktiviertes STAT5 schon in einer Vielzahl von Tumoren, im Besonderen in diversen Leukämien, nachgewiesen werden konnte, ist es keineswegs abwegig, ein STAT3-ähnliches Verhalten auch für STAT5 zu postulieren. Unterstrichen wird diese Vermutung durch Experimente mit Zellen von Patienten mit akuter myeloider Leukämie, die eine konstitutiv aktive Variante von JAK2 (V₆₁₇F) exprimieren und die IL-1 β -vermittelte CCL1-Expression nur bei gleichzeitiger Hemmung des JAK/STAT-Signalwegs durch den JAK Inhibitor 1 erlauben (Abb.29).

Die verstärkte Expression von CCL1 in Abwesenheit von STAT5 geht nicht auf eine abweichende, OSM-induzierte Phosphorylierung von STAT1 oder STAT3 zurück (Abb.25), wie dies im Fall von Mäusen mit spezifisch in der Leber mutiertem STAT5a/b als Antwort auf Wachstumshormone gezeigt werden konnte (186). Auch bei den für die CCL1-Induktion wichtigen MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 ist in ihrer Aktivierung kein Unterschied zwischen Wildtyp- und STAT5-defizienten MEFs erkennbar (Abb.25). Der Vergleich der *feedback*-Inhibitoren SOCS1, SOCS3 und CIS innerhalb des OSM-induzierten Signalwegs offenbart jedoch in STAT5^{-/-}-MEFs die fehlende Induktion von CIS, einem klassischen STAT5 Zielgen und *feedback*-Inhibitor (Abb.25). Da eine CIS-Defizienz zur gesteigerten CCL1-Produktion führt (Abb.26) und die CIS-Überexpression die erhöhten CCL1-Spiegel in STAT5-defizienten Zellen auf Wildtypniveau reduziert (Abb.27), ist funktionell bewiesen, dass das Fehlen von CIS selbst für die erhöhte CCL1-Sekretion verantwortlich ist. In entsprechender Weise resultiert auch der *knock-down* von konstitutiv exprimiertem CIS in HEL-Zellen, einer akuten myeloiden Leukämiezelllinie, in einer konstitutiven Expression von CCL1 (Abb.29). Im Verlauf des klassischen *feedback*-Prozesses bindet CIS an phosphorylierte Tyrosinreste zytoplasmatischer Domänen von STAT5-aktivierenden Rezeptoren und blockiert somit eine fortlaufende Aktivierung von STAT5 (187). In Folge

dessen sind CIS-transgene Mäuse augenscheinlich identisch mit STAT5a/b *knock-out*-Mäusen (188). Dieser klassische *feedback*-Mechanismus kann jedoch nicht als Erklärung für den beobachteten negativen Effekt von STAT5 auf die CCL1-Expression dienen. Erwartungsgemäß hätte nach einem CIS-*knock-down* eine verminderte CCL1-Sekretion nachweisbar sein müssen, da reprimierend wirkendes STAT5 länger aktiviert bleiben müsste. Da die CCL1-Sekretion aber ansteigt, muss es sich hier um einen anderen molekularen Mechanismus handeln. Es gibt andere Publikationen, die belegen, dass CIS die Funktion eines *scavenger*-Proteins übernehmen kann, indem es phosphorylierte Proteine wie zum Beispiel Rezeptoren bindet und über den Ubiquitin/Proteasom-abhängigen Signalweg der Degradation zuführt (188,189). Die Tatsache, dass alle untersuchten Signalwege (Abb.25) in STAT5-defizienten MEFs, die bis zu 16 h mit OSM stimuliert wurden, normal aktiviert werden, spricht gegen eine durch CIS eingeleitete Degradation des OSMRs oder von gp130 und auch gegen andere durch CIS negativ beeinflusste membranproximale Signaltransduktionsschritte. Bemerkenswerterweise unterdrückt CIS, wie im Falle von OSM, nicht nur die CCL1-Expression von Zytokinen, die selbst auch CIS induzieren, sondern auch die IL-1 β -vermittelte CCL1-Expression, obwohl IL-1 β selbst nicht befähigt ist, CIS zu induzieren (Abb.29). CIS wirkt also nicht nur, wie im Falle von OSM, in *cis*, sondern wie am Beispiel von IL-1 β verdeutlicht, auch in *trans*. Diese Ergebnisse legen nahe, dass CIS seine Wirkung proximal zum CCL1-Promotor ausübt.

IV.3 Die CCL13-Induktion in synovialen Fibroblasten unterstreicht die signifikante Bedeutung von OSM in der rheumatoiden Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine schwerwiegende, chronische Erkrankung, die sowohl zu dauerhaften Gelenksschädigungen, als auch zu extraartikulären Symptomen führt. Diese haben ihrerseits entscheidenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf und die Mortalitätsrate (190,191). Der tatsächliche Auslöser und der pathologische Verlauf der rheumatoiden Arthritis sind bislang nur unvollständig erforscht. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass es sowohl innerhalb des

zellulären Immunsystems, als auch im Zusammenspiel diverser Zytokine zu grundlegenden Dysregulationen kommt (192,193). Der Erfolg einer antiinflammatorischen Zytokintherapie, die sich entweder gegen TNF α oder in geringerem Umfang gegen IL-1 richtet, hebt die Bedeutung dieser Zytokine für den Krankheitsverlauf der RA deutlich hervor (194-197). Nichtsdestotrotz führen diese therapeutischen Strategien nur bei ca. 70 Prozent aller Patienten zum Erfolg; ein Beleg dafür, dass weitere Zytokine Einfluss auf den Krankheitsverlauf der rheumatoiden Arthritis nehmen können. Die Ergebnisse diverser Studien zeigen, dass sich auch andere Zytokine wie IL-6, IL-4, IL-13, IFN γ und von aktivierten T-Zellen, Makrophagen oder Neutrophilen sezerniertes Oncostatin M in der Synovialflüssigkeit chronisch entzündeter Gelenke finden (28,198-202).

Weitere Publikationen zeigen, dass die intraartikuläre Überexpression von OSM in transgenen Mäusen Gelenkentzündungen und Knorpelschädigungen hervorruft (203,204). Darüberhinaus verdeutlicht ein Mausmodell, in dem die Gabe von OSM-neutralisierenden Antikörpern einen chronischen RA-Verlauf abschwächt, die Bedeutung von Oncostatin M in der rheumatoiden Arthritis (205). Die Freisetzung von Proteoglykanen und Kollagen des Knorpels, die verstärkte Expression von angiogenen Faktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) oder FGF (*fibroblast growth factor*) sowie die Förderung der Proliferation synovialer Fibroblasten reflektieren den Einfluss von OSM auf die krankheitsbedingte Umstrukturierung des Gelenks im Verlauf der rheumatoiden Arthritis (206,207). *In vitro* moduliert OSM auch den Matrixumsatz in Synoviozyten und Chondrozyten, was die Bedeutung von OSM in der Regulation der Balance von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und von *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases* (TIMPs) am Schädigungsort unterstreicht (129,208-210). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass OSM den Umsatz extrazellulärer Matrix in Synergie mit proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IL-1 oder IL-17 induziert (208,211,212). Die Bedeutung von OSM für die Rekrutierung von Immunzellen zum Ort der Entzündung ist ebenfalls unumstritten. So werden Neutrophile Zellen zum Beispiel über die Hochregulation von P-Selektin rekrutiert, während die OSM-induzierte Expression des Chemokins CCL2 zur Migration von Monozyten führt (129).

Aktuelle Publikationen berichten auch über eine verstärkte CCL13-Expression in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten (213). Das erst kürzlich beschriebene CC-Chemokin CCL13 konnte über eine humane cDNA-Bibliothek identifiziert werden. Es besitzt die Fähigkeit, die Migration von eosinophilen Granulozyten, Monozyten und T-Lymphozyten durch die Bindung an die Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR3 zu induzieren (214,215). Die Bedeutung von CCL13 ist bislang wenig erforscht, wobei neue Studien darauf hinweisen, dass CCL13 in allergischen Krankheitsverläufen wie Asthma oder der atopischen Dermatitis Aufgaben in der Rekrutierung von Immunzellen zukommen könnten (216,217).

IV.3.1 Die Induktion von CCL13 in der rheumatoiden Arthritis

Einzelne Publikationen unterstreichen durch den Nachweis erhöhter CCL13-Spiegel in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten die Bedeutung dieses Chemokins für den Verlauf einer rheumatoiden Arthritis (147,213). Frühere Studien konnten humane Chondrozyten infolge einer 48stündigen IFN γ -Stimulation als Quelle der erhöhten CCL13-Expression ausfindig machen. Eine zusätzliche Behandlung mit TNF α verstärkt synergistisch die CCL13-Synthese in Chondrozyten. Interessanterweise können aber weder TNF α , noch IL-1 β alleine CCL13 induzieren (213). Die Ergebnisse im dritten Teil dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass synoviale Fibroblasten (SFs) effizient CCL13 exprimieren. Die SFs aller getesteten Spender mit Rheumatoider Arthritis (RASFs) sezernieren konstitutiv CCL13. Dabei sind die basalen CCL13-Mengen bei Spendern, die zusätzlich auch noch konstitutiv geringe Mengen OSM produzieren, noch einmal signifikant höher (Abb.36). Darüberhinaus bewirkt die exogene Stimulation mit OSM die Sekretion substantieller CCL13-Mengen in SFs gesunder Spender (HSFs) und eine signifikant verstärkte CCL13-Expression in RASFs (Abb.33). Eine Stimulation mit IL-6, TNF α oder IL-1 β hat keinen Einfluss auf die CCL13-Sekretion synovialer Fibroblasten, obwohl alle Zytokine ihre entsprechenden Signalkaskaden in den Fibroblasten aktivieren (Abb.38) und die Expression von CCL2 ermöglichen (Daten nicht gezeigt).

IV.3.2 Die OSM-induzierte CCL13-Expression wird STAT5-abhängig vermittelt

Beachtlicherweise sind Haut- sowie Lungen- und Cervixfibroblasten nicht befähigt, OSM-abhängig CCL13 zu produzieren, obwohl alle diese Fibroblastentypen den OSMR exprimieren und OSM-vermittelte Signale die Sekretion von CCL2 ermöglichen (Abb.31 und (129)). Die vergleichende Analyse von OSM-, aber auch IL-6-, TNF α - oder IL-1 β -aktivierter Signalwege gibt erste Hinweise darauf, dass einzig OSM die Phosphorylierung von STAT5 induziert und dieser Transkriptionsfaktor somit potentiell für die OSM-induzierte CCL13-Expression verantwortlich sein könnte. Dieser Verdacht wird durch den siRNA-*knock-down* von STAT5 belegt. Die OSM-induzierte CCL13-Expression in HSFs wird durch den *knock-down* nahezu vollständig unterdrückt (Abb.38).

Interessanterweise führt eine OSM-Stimulation in allen Fibroblastentypen zu einer STAT5-Aktivierung (Abb.38). Eine genauere Betrachtung der STAT5-Aktivierungskinetiken zeigt jedoch, dass die STAT5-Aktivierung in Haut-, Lungen- und Cervixfibroblasten nur sehr transient, in synovialen Fibroblasten dagegen bis zu 8 h andauernd beobachtet werden kann. Die verlängerte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors allein kann die zellspezifische Regulation des CCL13-Gens aber nicht erklären. Die Überexpression einer konstitutiv-aktiven Variante von JAK2 (V₆₁₇F) in dermalen Fibroblasten führt zwar zu einer konstitutiven STAT5-Aktivierung, nicht aber zur CCL13 Expression (Daten nicht gezeigt). Weitergehende Studien müssen sich zukünftig die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die die CCL13-Expression alleinig in synovialen Fibroblasten ermöglichen, zum Ziel setzen.

IV.3.3 Die Bedeutung der MAP-Kinasen für die CCL13-Expression in synovialen Fibroblasten

Erstaunlicherweise verläuft die konstitutive CCL13-Expression in RASFs STAT5-unabhängig. Der STAT5-*knock-down* in diesen Zellen reduziert nicht die basal exprimierten CCL13-Mengen (Abb.41). Da aber ein neutralisierender OSM-Antikörper die basal exprimierten CCL13-Mengen in RASFs um 50% reduziert, ist OSM auch an der konstitutiven CCL13-Sekretion beteiligt (Abb.34). Der Einsatz

pharmakologischer Inhibitoren gegen die MAPK ERK1/2 und p38 zeigt, dass diese Kinasen entscheidende Bedeutung für die konstitutive CCL13-Expression besitzen. Die gleichzeitige Inhibition beider Kinasen bewirkt eine vollständige Hemmung der CCL13-Expression (Abb.39), obgleich beide Kinasen unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Wie schon zuvor für das Chemokin CCL1 beobachtet, so ist p38 auch für die Stabilisierung der CCL13-mRNA unabdingbar, indem es das mRNA-destabilisierende Protein TTP phosphoryliert und damit in seiner Wirkung inhibiert (Abb.40). ERK1/2 dagegen sind direkt in den Transkriptionsprozess involviert (Abb.41 und Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Publikationen, die die Bedeutung von ERK1/2 und p38 für die Chemokinexpression und deren mRNA-Stabilität beschreiben (112,115,218).

Festzuhalten bleibt, dass die Aktivität von p38 wichtig für die konstitutive und OSM-induzierte CCL13-Expression ist, während die Phosphorylierung von ERK1/2 im Besonderen die basale CCL13-Sekretion in RASFs ermöglicht und sich nur in geringem Umfang für die CCL13-Transkription durch exogenes OSM verantwortlich zeigt.

IV.3.4 Die konstitutive CCL13-Expression in RASFs

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Studie ist die Tatsache, dass OSM den einzigen löslichen Faktor darstellt, der konstitutiv von RASFs sezerniert wird und die Expression von CCL13 induzieren kann. Die Transferexperimente, in denen RASF-Zellüberstände auf HSFs übertragen wurden, zeigen in Anwesenheit eines OSM-neutralisierenden Antikörpers die vollständige Blockade der CCL13-Produktion (Abb.35). Dieses Resultat schließt natürlich nicht aus, dass auch andere lösliche Faktoren konstitutiv in RASFs exprimiert werden, die ihrerseits an der Expression weiterer Chemokine oder anderer inflammatorischer Proteine beteiligt sind und hier nicht analysiert wurden. So berichten frühere Publikationen beispielsweise über die konstitutive Expression von IL-6, IL-11 (199) oder IL-22 (219) in RASFs.

Obwohl OSM den einzigen transferierbaren Faktor darstellt, der eine CCL13-Induktion ermöglicht, trägt es lediglich zu 50% zur konstitutiven CCL13-Produktion

in RASFs bei (Abb.34). Synoviale Fibroblasten von Spendern mit rheumatoider Arthritis scheinen sich von denen gesunder Spender durch eine basale Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 zu unterscheiden. Weiterführende Ergebnisse bestätigen diese Vermutung (Daten nicht gezeigt), wenngleich der Aktivierungsstatus der Kinasen nahe am Detektionslimit der durchgeführten Western Blots liegt. Im Einklang dazu stehen Studien, die die Bedeutung von Protoonkogenen wie *ras*, *raf* und *myc* für die Genexpression in RASFs aufklären sollten und über eine starke Reduktion konstitutiver MMP-1- und MMP-3-Expression infolge eines Gentransfer dominant negativer Mutanten von Raf-1 und c-Myc berichten (220).

IV.3.5 Die physiologische Bedeutung von CCL13 für die rheumatoide Arthritis

Die CCL13-Sekretion trägt signifikant zur Migration primärer Monozyten bei, deren Migrationsrate sich durch Zusatz eines CCL13-neutralisierenden Antikörpers um 50% reduziert (Abb.37). Dabei fällt auf, dass auch eine CCL2-Blockade zu keiner höheren Reduktion der Migrationsrate führt und damit beide Chemokine ein vergleichbares Potential zur Monozytenrekrutierung besitzen. Der kombinierte Einsatz der blockierenden Antikörper gegen CCL2 und CCL13 kann die Migrationsrate der primären Monozyten nicht weiter reduzieren. Dieses Resultat kann sich durch die gemeinsame Nutzung des Chemokinrezeptors CCR2 auf Monozyten erklären (214). Weiterhin belegen die verbleibenden 50% aller migrierten Monozyten, dass sich weitere, bislang nicht analysierte und durch OSM induzierte Chemokine im HSF-Zellüberstand befinden, die ihrerseits das Potential besitzen, Monozyten zu rekrutieren.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für RA-Patienten, die nicht auf die etablierten, gegen IL-1 oder TNF α gerichteten Therapien ansprechen, ein OSM-abhängiger und damit ein komplett TNF α -/IL-1-unabhängiger regulatorischer Kreislauf von großer Bedeutung für das Fortschreiten der rheumatoiden Arthritis sein kann. In diesem Kontext können einwandernde Neutrophile OSM sezernieren, welches dann selbst einen potenten Induktor von GM-CSF (221) und IL-6 (204) darstellt. Dies könnte erklären, weshalb nur ca. 70% der RA-Patienten

effektiv auf anti-TNF α - und anti-IL-1-Therapien ansprechen. Darüberhinaus untermauern die Experimente in diesem Teil der Arbeit aktuelle Forschungsergebnisse, die belegen, dass sich synoviale Fibroblasten signifikant in ihrer Fähigkeit, inflammatorische Immunantworten zu modulieren, von anderen Fibroblastentypen unterscheiden (222). Letztlich könnte der bedeutungsvolle Einfluss von OSM für den Verlauf einer rheumatoiden Arthritis zukünftige therapeutische Optionen gegen diese Krankheit eröffnen.

IV.4 Der Einfluss von OSM auf den Ablauf einer antiviralen Immunantwort

Zellen, die mit einem Virus infiziert sind, produzieren folglich virusspezifische Moleküle wie zum Beispiel einzel- oder doppelsträngige DNA bzw. RNA oder auch Glykoproteine, die dann durch sogenannte PRRs (*pattern recognition receptors*) erkannt werden können, zu denen auch die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und die erst in der jüngeren Vergangenheit entdeckten DExD/H-Box Helikasen gehören. (148,150,223-226). Vor allem für den in der Endosomenmembran lokalisierten TLR3 konnte gezeigt werden, dass er sowohl virale, doppelsträngige RNA (dsRNA), als auch das synthetische dsRNA-Analog poly(I:C) (*polyinosine-polycytidylic acid*) erkennt (227,228). Die Helikasen RIG-I und MDA5 wurden als zytoplasmatisch lokalisierte Detektoren viraler RNA identifiziert (148,154,229-231), was ein grundlegendes Verständnis dieses alternativen Wegs zur Detektion von Viren in der Zelle unterstützt. Sowohl RIG-I, als auch MDA5 beinhalten zwei Caspase-Rekrutierungsdomänen (CARDs) und eine DExD/H-Box Helikasedomäne. Während die Helikasedomäne für die Wechselwirkung mit doppelsträngiger RNA verantwortlich ist, ermöglichen die CARD-Domänen die Interaktion mit weiteren Adapterproteinen, um untergeordnete Signalkaskaden zu aktivieren (148). Phosphorylierte Formen von IRF3 und IRF7 initiieren die Transkription von Typ-I Interferonen, die ihrerseits nach Sekretion autokrin wirken. Durch Bindung der Interferone an ihre Rezeptoren IFNAR1 und IFNAR2 und die folgende Aktivierung des JAK/STAT-Wegs wird die Produktion interferonspezifischer Effektormoleküle ermöglicht und so ein antiviraler Status in der Zelle

etabliert (223). Parallel zur IRF3-Phosphorylierung wird auch NF κ B durch die RNA Helikasen aktiviert, dessen phosphorylierte Form seinerseits die zusätzliche Expression von inflammatorischen Zytokinen und damit Antworten des adaptiven Immunsystems ermöglicht (232-235).

Ohne Zweifel stellen die Typ-I Interferone die Schlüsselzytokine im Verlauf einer antiviralen Immunantwort dar, da sie wie beschrieben sowohl Antworten des angeborenen, als auch des adaptiven Immunsystems nach sich ziehen (223,236,237). Darüberhinaus zeigen aber diverse Arbeiten, dass inflammatorische Zytokine neben der Regulation des adaptiven Immunsystems auch direkte Funktionen in der antiviralen Immunabwehr übernehmen können. So scheinen IL-1 β und TNF α von besonderer Bedeutung für den Verlauf einer HSV-1 Enzephalitis zu sein, da entsprechende *knock-out*-Mäuse nach HSV-1-Infektion eine signifikant höhere Mortalitätsrate aufweisen als die Wildtypiere (157). Obwohl für IL-6 eindeutig nachgewiesen wurde, dass es keine direkte antivirale Aktivität besitzt (126,127), legen dennoch einige Publikationen eine modulierende Funktion dieses Zytokins nahe. IL-6-*knock-out*-Mäuse zum Beispiel weisen eine deutlich reduzierte antivirale Antwort (3) und mit dem Influenza A Virus infizierte Mäuse eine signifikant höhere Mortalitätsrate nach Behandlung mit einem IL-6-blockierenden Antikörper auf (238). Eine weitere Studie belegt, dass Oncostatin M eine Vielzahl klassischer Interferonzielgene (ISGs) induzieren kann, was letztlich gewisse Ähnlichkeiten zwischen der OSM- und IFN-vermittelten Signaltransduktion vermuten lässt.

IV.4.1 Oncostatin M induziert die RNA-Helikasen RIG-I und MDA5 in primären Fibroblasten

Es ist allgemein akzeptiert, dass eine virale Infektion über die zuvor geschilderten Signalwege zur Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen führt. Dennoch wurde trotz der oben beschriebenen potentiellen Modulationen einer viralen Immunabwehr durch inflammatorische Zytokine nie ein direkter Einfluss dieser Mediatoren auf die transkriptionelle Regulation der Helikasen RIG-I und MDA5 beschrieben. Lediglich für TNF α ist bekannt, dass es die transkriptionelle Regulation von RIG-I indirekt verstärkt, indem es die mRNA von IFN ϵ stabilisiert

(239). Der Befund, dass OSM klassische ISGs wie IRF1 und GBP2, als auch die DExD/H-Box-Helikasen RIG-I und MDA5 direkt induziert, ist völlig neu (Abb.43). Als noch beachtenswerter erscheinen diese Ergebnisse, wenn man berücksichtigt, dass kein anderes der untersuchten IL-6-Typ Zytokine diese Fähigkeit besitzt und OSM die ISGs deutlich schneller, wenn auch transienter als IFN γ induziert (Abb.44). Eine Ausnahme bildet dabei GBP2, welches auch 12 h nach Stimulationsbeginn noch nachweisbar ist. Eine mögliche Erklärung für diese verlängerte Proteinexpression könnte eine im Vergleich zu IRF1, RIG-I und MDA5 verlängerte GBP2-Halblebenszeit sein.

Die Tatsache, dass man eine OSM-induzierte Expression von RIG-I lediglich in primären Fibroblasten, nicht aber in Krebszelllinien nachweisen kann, steht im Einklang mit publizierten Ergebnissen, die aus RIG-I- und MDA5-defizienten Mäusen gewonnen wurden. Dabei ist eine virusinduzierte IFN-Produktion in Fibroblasten und dendritischen Zellen von RIG-I-*knock-out*-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen vollständig unterdrückt (150). Eine vergleichbare Zellspezifität konnte in MDA5-*knock-out*-Mäusen beobachtet werden (122). Der Grund für die zellspezifische Expression der Helikasen könnte auch auf spezielle, durch OSM aktivierte Signalkaskaden zurückzuführen sein. So ist OSM nur in den primären Fibroblasten, nicht aber in den untersuchten Krebszelllinien dazu befähigt, die für eine RIG-I-Expression unabdingbare, gleichzeitige Tyrosin- und Serinphosphorylierung von STAT1 zu induzieren (Abb.44).

IV.4.2 Die durch p38 vermittelte STAT1-Serinphosphorylierung ermöglicht die Expression der DExD/H-Box Helikasen

Im Gegensatz zur schnellen STAT1-Tyrosinphosphorylierung erfolgt die IFN γ -vermittelte Serinphosphorylierung von STAT1 deutlich langsamer und erklärt damit die signifikante Verzögerung der IFN γ -induzierten RIG-I-Expression im Vergleich zur OSM-vermittelten Induktion der Helikase (Abb.45). Dieses STAT1-Aktivierungsmuster steht im Einklang mit Beobachtungen von Decker und Kovarik, die beschreiben, dass eine vorangegangene IFN γ -induzierte STAT1-Tyrosinphosphorylierung eine anschließende Serinphosphorylierung dieses

Transkriptionsfaktors begünstigt und deshalb 90% aller serinphosphorylierten STAT1-Moleküle auch tyrosinphosphoryliert vorliegen (158,240).

Zellulären Stress verursachende Stimuli wie UV-Licht, LPS oder TNF α vermitteln lediglich die STAT1-Aktivierung an Serin S₇₂₇ (73,241,242), sodass nur spätere, indirekte Effekte wie die induzierte Sekretion weiterer Zytokine eine zusätzliche STAT1-Tyrosinphosphorylierung und damit die Expression von RIG-I ermöglichen. Die Position, an der STAT1 serinphosphoryliert wird, liegt inmitten der Aminosäuresequenz PMSP, die eine potentielle Zielsequenz für Phosphorylierungen durch prolängerichtete MAP-Kinasen darstellt. Um den tatsächlichen Einfluss dieser Kinasen auf die STAT1-Serinphosphorylierung zu ermitteln, wurden die OSM-behandelten Fibroblasten zuvor mit etablierten, pharmakologischen Inhibitoren inkubiert (Abb.46). Im Gegensatz zur IFN γ -vermittelten Serinphosphorylierung von STAT1, die durch eine bislang unbekannte Kinase induziert wird, erfolgt die OSM-vermittelte Phosphorylierung, wie im Falle von LPS, UV und TNF α bereits beschrieben, durch p38 (242).

Der letztendliche Grund, warum die OSM-vermittelte RIG-I-Induktion von einer gleichzeitigen Tyrosin- und Serinphosphorylierung von STAT1 abhängig ist, erfordert weitergehende Studien. Es könnte sein, dass die doppelte Phosphorylierung die DNA-Bindungseigenschaften von STAT1 beeinflusst. So zeigen zumindest einige Publikationen eine Korrelation zwischen der STAT1-Serinphosphorylierung und der daraufhin gesteigerten DNA-Bindungsfähigkeit dieses Transkriptionsfaktors auf (243-245), obwohl entsprechende Mutationen im STAT1-Gen diese Vermutungen nicht unterstützen (158). Auf der anderen Seite kann eine doppelte STAT1-Phosphorylierung, wie für IFN γ bereits nachgewiesen, eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors bewirken (240,242,246-248).

Der komplette STAT1-*knock-down* führt wie erwartet zum völligen Verlust der OSM-induzierten RIG-I und MDA5-Expression und unterstützt damit Daten von Kang *et al.*, die eine fehlende MDA5-Induktion in STAT1-defizienten Mäusen aufzeigen (249).

IV.4.3 OSM-stimulierte Lungenfibroblasten sind für eine Stimulation mit dem synthetischen dsRNA Analog poly(I:C) sensibilisiert

Die Vorbehandlung von humanen Lungenfibroblasten mit Oncostatin M ermöglicht es diesen Zellen, auf poly(I:C)-Dosen zu reagieren, die normalerweise nicht die Aktivierung des IRF3-Signalwegs nach sich ziehen. So aber wird nicht nur IRF3 selbst als Schlüsselprotein in der Regulation von IFN-Genen aktiviert (250-252), sondern auch die Ausschüttung von IFN β induziert (Abb.48). Von Costa-Pereira *et al.* wurde bereits ein vergleichbarer *priming*-Effekt für IFN γ beschrieben (253), der in den Abbildungen 47 und 48 bestätigt wird. Im Falle der OSM-Vorbehandlung könnten die induzierten Helikasen MDA5 und RIG-I die gesteigerte Responsivität gegenüber doppelsträngiger DNA und damit die verstärkte antivirale Antwort vermitteln. Dafür sprechen zumindest erste Ergebnisse antiviraler assays, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Ana Costa-Pereira (Imperial College London) angefertigt wurden. Weiterhin wird diese Vermutung durch einen kompletten STAT1-*knock-down* und die folglich unterbundene Expression der DExD/H-Box-Helikasen, die zum völligen Verlust des beobachteten, OSM-abhängigen *priming*-Effekts führt, untermauert (Abb.46). Ob primär eine einzelne oder beide Helikasen in gleichem Maße zur Detektion der dsRNA beitragen, lässt sich aus den durchgeführten Experimenten nicht erkennen. Verschiedenste Publikationen beschäftigen sich bereits mit der Substratspezifität der RLRs, aber noch scheint es nicht endgültig geklärt, ob poly(I:C) durch RIG-I, durch MDA5 oder durch beide Helikasen erkannt wird (122,254-256).

IV.4.4 Als Überlebensstrategie inhibiert das VSV die OSM-induzierte RIG-I- und MDA5-Expression

Viele Publikationen berichten über eine Interaktion viraler Proteine mit dem Immunsystem des Wirts, um eine Abwehrreaktion des Wirtes zu unterbinden und das eigene Überleben zu sichern. Einzelne dieser Virusproteine interagieren auch mit den RLRs, was deren Wichtigkeit für die virale Immunabwehr nochmals unterstreicht. Das V-Protein der Paramyxoviren NDV und SeV beispielsweise

bindet spezifisch an MDA5 und verhindert so eine anschließende Signalkaskade, die zur Produktion von Interferonen führen könnte (229,255,257). Vergleichbares ist für das NS1-Protein des Influenza A Virus beschrieben, dass mit RIG-I interagiert (258-260). Um Signalkaskaden des Wirts zu unterbrechen, beschreitet das *vesicular stomatitis virus* einen ganz anderen Weg, der bereits von Terstegen *et al.* näher untersucht wurde. So bewirkt die VSV-Infektion von HeLa-Zellen und auch die alleinige Überexpression des VSV-M-Proteins die Inhibierung der IL-6-induzierten STAT1- und STAT3-Phosphorylierung (159). Diese Ergebnisse bewahrheiten sich ebenfalls für die OSM-abhängige Aktivierung von STAT1 und STAT3 (Abb.49). Der genaue Inhibitionsmechanismus ist noch unbekannt und muss in zukünftigen Studien noch genauer analysiert werden. Interessanterweise werden dabei weder die JAK1- und ERK1/2-Phosphorylierung, noch die Oberflächenexpression von gp130 beeinflusst (Abb.49). Eine direkte Interaktion des M-Proteins mit den Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 könnte die fehlende Aktivierung erklären. Die Tatsache, dass eine VSV-Infektion einer Zelle deren RNA- und Proteinsynthese inhibiert, kann keine Erklärung für die unterdrückte STAT1- und STAT3-Phosphorylierung darstellen, da die Proteinspiegel der Transkriptionsfaktoren konstant bleiben. Die inhibierte RIG-I- und MDA5-Expression kann dagegen sehr wohl auch auf die M-Protein-vermittelte Reduktion der RNA- und Proteinsynthese innerhalb der infizierten Zellen zurückzuführen sein (Abb.49) und muss damit nicht zwangsläufig in der fehlenden STAT1-Aktivierung begründet liegen. Die unterbliebene Aktivierung von IRF3 in mit OSM prästimulierten Zellen (Abb.50) kann mit der durch das M-Protein inhibierten Expression von RIG-I und MDA5 und einer damit einhergehenden, ausbleibenden Sensibilisierung der Fibroblasten für eine poly(I:C)-Stimulation erklärt werden, die sich letztlich in der ausbleibenden IFN β -Produktion widerspiegelt (Abb.50). Eine andere, mögliche Begründung für die Inhibierung der IFN β -Produktion besteht in der Fähigkeit des M-Proteins, mit zellulären Promotoren wie beispielsweise dem IFN β -Promotor selbst zu interagieren und so die Gentranskription des Wirts auf der Ebene der RNA-Polymerasen zu stören (261,262). Dieser Mechanismus kann auch die unterbliebene IFN β -Sekretion in Lungenfibroblasten erklären, in denen sich, bei gleichzeitiger Anwesenheit des

M-Proteins trotz Stimulation mit ausreichenden poly(I:C)-Dosen (100µg/ml) keine antivirale Antwort induzieren lässt (Abb.50). Ein wiederum völlig anderer Mechanismus muss in diesem Zusammenhang für die Inhibierung der IRF3-Phosphorylierung nach Überexpression des M-Proteins verantwortlich sein und in künftigen Experimenten untersucht werden.

V. Ausblick

Die in der vorliegenden Dissertation erzielten Ergebnisse liefern eine Reihe interessanter Ausgangspunkte für weitergehende Untersuchungen der OSM-induzierten Signalweiterleitung und deren Bedeutung für die OSM-vermittelte Genexpression im Kontext inflammatorischer Prozesse sowie antiviraler Immunantworten. Im folgenden Abschnitt werden aufgeworfene Fragen und Ansatzpunkte für mögliche Folgeuntersuchungen kurz zusammengefasst.

V.1 Die Rekrutierung von JAK2 an den OSMR

Die Untersuchungen der molekularen Mechanismen, die die Aktivierung von STAT5 über den humanen und murinen OSMR ermöglichen, haben gezeigt, dass nur eine einzelne Aminosäure, Phenylalanin F₈₂₀, in der Box2-Region des humanen OSMR für die präferenzielle Rekrutierung von Jak1 im humanen System verantwortlich ist. Mutiert man dieses im humanen Rezeptor vorhandene Phenylalanin zum im murinen Rezeptor vorhandenen Cystein, dann bindet auch der humane Rezeptor wie sein murines Gegenstück präferenziell JAK2 und aktiviert STAT5 unabhängig von Rezeptortyrosinen. Es wird interessant sein herauszufinden, wie der Austausch einer einzelnen Aminosäure die Rekrutierung von Janus Kinasen an den OSMR derart beeinflussen kann. Eine mögliche kovalente Bindung von JAK2 an die Aminosäure Cystein widerspricht zwar den eigentlichen Bindungseigenschaften zwischen Rezeptoren und assoziierten Janus Kinasen, könnte aber die erhaltenen Resultate erklären. Mit Hilfe einer nativen Gelelektrophorese ließe sich diese Überlegung überprüfen.

Die beobachtete Koimmunpräzipitation zwischen JAK1 und JAK2 im humanen System wirft die Frage auf, über welche Domänen die Janus Kinasen miteinander interagieren. Diverse, bereits zur Verfügung stehende Punkt- und Deletionsmutanten der Janus Kinasen können stabil in JAK1- bzw. JAK2-defiziente Fibrosarkomzellen eingebracht werden, sodass mittels Koimmunpräzipitation die Interaktion der Kinasen überprüft werden könnte. Durch Charakterisierung der bekannten OSM-aktivierten Signalwege kann dann

zusätzlich untersucht werden, welche Konsequenz der Verlust einer JAK1/JAK2-Interaktion für die Aktivierbarkeit der Signalwege hat.

Institutsinterne Daten weisen im Weiteren darauf hin, dass die OSM-induzierte Aktivierung von PLC γ über den humanen OSMR ebenfalls über das Doppelyrosinmotiv Y₈₃₇/Y₈₃₉ vermittelt wird. Da auch im murinen System eine PLC γ -Phosphorylierung möglich ist, drängt sich die Frage auf, ob der OSM-induzierten PLC γ -Aktivierung im murinen System ein vergleichbarer Mechanismus zugrunde liegt, der in dieser Arbeit für STAT5 beschrieben werden konnte. Entsprechende Versuchansätze mit den bereits in dieser Arbeit verwendeten chimären Rezeptorkonstrukten werden darüber Aufschluss geben.

V.2 Die Bedeutung des *feedback*-Inhibitors CIS für die OSM-induzierte CCL1-Expression

Interessanterweise unterdrückt der *feedback*-Inhibitor CIS, wie im Falle von OSM, nicht nur die CCL1-Expression von Zytokinen, die selbst CIS induzieren, sondern auch die IL-1 β -vermittelte CCL1-Expression, obwohl IL-1 β selbst CIS nicht zu induzieren vermag. CIS wirkt also nicht nur wie im Falle von OSM in *cis*, sondern wie am Beispiel von IL-1 β verdeutlicht, auch in *trans*. Die Vermutung, dass CIS seine Wirkung proximal zum CCL1-Promotor ausübt, kann durch mögliche Deletionsstudien des CCL1-Promotors sowie darauf basierenden Chromatin-Immunpräzipitationen überprüft werden.

Neuere Publikationen zeigen, dass der CCL1-Rezeptor CCR8 vermehrt auf $\gamma\delta$ -T-Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert wird und dort als *homing*-Rezeptor fungiert (263). Da humane dermale Fibroblasten befähigt sind, CCL1 zu sezernieren und entsprechende Immunzellen zu rekrutieren, wäre es sehr interessant zu erfahren, ob die CCL1-Expression in Melanomzellen ähnlich wie in den Zellen von Patienten mit akuter myeloider Leukämie inhibiert wird, um einen effektiven Kampf des Immunsystems gegen den Tumor zu verhindern. Experimente, die bereits im zweiten Teil dieser Arbeit die Analyse der CIS-

bedingten CCL1-Repression erlaubten, können in gleicher Weise mit Melanomzellen durchgeführt werden und entsprechende Vermutungen bestätigen bzw. widerlegen.

Die Etablierung der RPA-Methodik ermöglicht zukünftig auch die problemlose Analyse der weniger untersuchten CC- und aller CXC-Chemokine, da entsprechende Chemokin-*template-sets* zur Verfügung stehen. Im Hinblick auf die OSM-induzierte Expression von Chemokinen bei myeloproliferativen oder melanozytären Erkrankungen wird es interessant sein zu erfahren, ob auch die Expression des Chemokins CXCL4 induziert wird. Für dieses Chemokin wurde erst kürzlich gezeigt, dass es seinerseits die Expression von T-Zell-rekrutierenden Chemokinen wie beispielsweise CXCL12 oder CXCL14 inhibiert, sodass eine gesteigerte CXCL4-Expression in Krebszellen einen Vorteil für Tumore im Kampf gegen das Immunsystem darstellen würde (persönliche Mitteilung, PD Dr. F. Petersen; Borstel).

V.3 Der Einfluss von CCL13 auf die Pathogenese einer rheumatoiden Arthritis

Die basale CCL13-Expression in RASFs ist zu 50% OSM-abhängig. Die andere Hälfte kann durch Inhibitoren gegen die MAP-Kinasen p38 und ERK1/2, nicht aber durch Block der Janus Kinasen unterdrückt werden. Da es sich aber um keinen transferierbaren Induktor handelt, muss es sich um endogene Stimulatoren handeln, wie beispielsweise die in diesem Zusammenhang erst kürzlich beschriebenen Oncogene Ras und Raf (264). Durch die Überexpression dominant negativer Varianten dieser Oncogene oder durch eine Sequenzanalyse der entsprechenden Gene in RASFs, kann diese Frage beantwortet werden. Neben dem potentiellen Einfluss von Oncogenen wäre auch eine Bedeutung von *microRNAs* denkbar, deren veränderte regulatorische Funktionen in RASFs erst vor einigen Monaten beschrieben wurden (265,266). Darüberhinaus wäre es sehr interessant, mehr über die Breite der in RASFs konstitutiv exprimierten Faktoren zu erfahren. Ein *cytokine-beat-array*, der die gleichzeitige Expressionsanalyse

verschiedener Zytokine mittels Durchflusszytometrie erlaubt, könnten an dieser Stelle viele neue Erkenntnisse bringen.

Die Analyse diverser RASF-Zellüberstände zeigt, dass man RASFs gemessen an ihrer Fähigkeit, geringe Mengen OSM zu produzieren, in „Typ-I-RASFs“ und „Typ-II-RASFs“ einteilen kann. Durch endogenes und autokrin wirkendes Oncostatin M wird die CCL13-Expression in „Typ-II-RASFs“ verdoppelt. Ob die sezernierten OSM-Mengen auch die Expression weiterer Chemokine bedingt, können entsprechende ELISAs aus Zellkulturüberständen zeigen. Zudem wird es sehr interessant sein zu erfahren, ob die „Typ-II-RASFs“ von RA-Patienten stammen, die zu den 30% der Patienten gehören, die auf keine der derzeitigen Therapien gegen die rheumatoide Arthritis ansprechen.

Die Migrationsassays mit primären Monozyten verdeutlichen eindrucksvoll die physiologische Relevanz des exprimierten Chemokins CCL13. Um diese Bedeutung nachhaltig zu manifestieren, wären sich an das bearbeitete Projekt anschließende Versuche mit entsprechenden Mausmodellen interessant. Unglücklicherweise ist das Chemokin MCP-4/CCL13 nicht im Genom der Maus kodiert, sodass sich entsprechende Versuche nicht in gleicher Weise auf das Maussystem übertragen lassen. Das in der Maus beschriebene Chemokin MCP-5 könnte zukünftig die Chance bieten, äquivalente Experimente im Mausmodell durchzuführen. Es bleibt jedoch abzuwarten, ob die komplette Aufklärung der MCP-5-Proteinstruktur eine tatsächliche Homologie beider Chemokine bestätigt.

Eine erst kürzlich erschienene Veröffentlichung zeigt, dass die Metalloproteinase MMP12 unter anderem dazu befähigt ist, Mitglieder der MCP-Familie durch proteolytische Spaltung zu inaktivieren (267). Die hier erhaltenen Ergebnisse mit synovialen Fibroblasten belegen eindeutig die physiologische Aktivität von CCL13. Weitere institutsinterne Daten zeigen, dass OSM in HSFs und RASFs nicht zur gleichzeitigen Induktion von MMP12 und CCL13 befähigt ist. Möglicherweise induzieren aber andere prominente Zytokine die MMP12-Expression in Zellen des Synoviums, sodass es im physiologischen Kontext zu einer CCL13-Inaktivierung kommen kann. Entsprechende RT-PCR- oder RPA-Analysen können darüber

Aufschluss geben, ob MMP12 von im Knie lokalisierten Zellen produziert wird. Der Transfer entsprechender Zellkulturüberstände und angeschlossene MMP12-Depletionen sowie die finale Durchführung von Migrationsassays könnten dann gegebenenfalls die diskutierte Fragestellung beantworten.

Die Analyse der OSM-induzierten STAT5-Phosphorylierungskinetiken zeigt, dass der Transkriptionsfaktor lediglich in synovialen Fibroblasten, nicht aber in anderen Fibroblastentypen über mehrere Stunden aktiviert bleibt. Im Gegensatz dazu verläuft die Aktivierung anderer STAT-Faktoren und MAPK wie in den übrigen Fibroblasten. RT-PCRs könnten leicht Aufschluss darüber geben, ob eine im Vergleich zu anderen Fibroblasten deutlich abgeschwächte oder verspätete OSM-induzierte Expression des STAT5-*feedback*-Inhibitors CIS in HSFs für die verlängerte Aktivierung des Transkriptionsfaktors verantwortlich ist. Weitere Koimmunpräzipitationen können darüberhinaus zeigen, ob der in synovialen Fibroblasten bereits mehrfach als Signalprozesse modulierende Korezeptor CD44 eventuell Einfluss auf die OSM-vermittelte STAT5-Aktivierung nimmt und sich somit eine verlängerte Aktivierung des Transkriptionsfaktors erklärt.

V.4 Die antivirale Wirkungsweise der OSM-induzierten DExD/H-Box Helikasen RIG-I und MDA5

Virale Proteine interagieren oftmals mit dem Immunsystem des Wirts, um einer Entdeckung zu entgehen und das eigene Überleben zu sichern. So bewirkt unter anderem die Infektion von HeLa-Zellen mit dem *vesicular stomatitis virus* die Inhibition der IL-6-vermittelten STAT3-Aktivierung (159). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass letztlich sogar die alleinige Überexpression des VSV-M-Proteins die Inhibition der OSM-induzierten STAT1- und STAT3-Phosphorylierung unterbindet, während JAK1 und ERK1/2 nach OSM-Stimulation weiterhin normal aktiviert werden können. Diese Ergebnisse deuten auf eine direkte Interaktion des M-Proteins mit den beiden Transkriptionsfaktoren hin. Versuche, in denen das Wildtypprotein bzw. Punkt- und Deletionsmutanten des Matrixproteins überexprimiert werden, können mittels anschließend durchgeführter

Koimmunpräzipitationen Aufschluss darüber geben, ob und wie die STAT-Faktoren mit dem viralen Protein wechselwirken.

Die OSM-vermittelte Expression der DExD/H-Box-Helikasen RIG-I und MDA5 ist von der gleichzeitigen Serin- und Tyrosinphosphorylierung von STAT1 abhängig. Möglicherweise verbessert die doppelte Phosphorylierung dabei die DNA-Bindungseigenschaften von STAT1. Um dies genauer zu erforschen, können Kernextrakte von OSM- bzw. entsprechend mit dem p38 Inhibitor SB202190 stimulierten Fibroblasten in eine Chromatin-Immunpräzipitation oder in einen EMSA eingesetzt werden.

Es wird interessant sein, mit Hilfe antiviraler assays mehr über die physiologische Relevanz der OSM-vermittelten Expression der DExD/H-Box Helikasen zu erfahren. Dabei wird sich zeigen, ob OSM allein oder eventuell auch synergistisch mit anderen Interferonen auf den Verlauf einer antiviralen Immunantwort Einfluss nehmen kann.

Der virale Abwehrmechanismus gegen die OSM-induzierte Expression der RLRs und die daraus resultierende Sensibilisierung der Lungenfibroblasten auf eine virale Infektion bekräftigt die potentiell bedeutungsvolle Rolle dieses inflammatorischen Zytokins in der antiviralen Immunantwort. In Zukunft wird es interessant sein zu erfahren, welche Rolle OSM in einigen viral bedingten Krankheiten spielt. So stellt sich die Frage, ob OSM in der HIV-assoziierten Neurodegeneration nicht nur für den bereits näher erforschten, fortschreitenden neuronalen Schaden verantwortlich ist, sondern in diesem Kontext vielleicht auch bislang unbekannte antivirale Funktionen erfüllt (268,269). Die Tatsache, dass OSM auch in der Haut von AIDS-Patienten exprimiert wird, die an einem durch das humane Herpesvirus 8 induzierten Kaposi-Sarkom leiden, stellt dieses Zytokin ein weiteres Mal in den direkten Zusammenhang mit einer viralen Infektion (270). Möglicherweise agiert OSM auch hier, wie bereits beschrieben, nicht nur als autokriner Wachstumsfaktor, sondern übt in diesem Kontext zusätzliche antivirale Effekte aus.

VI. Zusammenfassung/Summary

VI.1 Zusammenfassung

Oncostatin M ist eines der inzwischen neun Mitglieder umfassenden IL-6-Typ Zytokin Familie, die durch die gemeinsame Nutzung der Rezeptoruntereinheit gp130 charakterisiert ist. OSM, das hauptsächlich von aktivierten T-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und polymorphkernigen Neutrophilen produziert wird, ist als einziges IL-6-Typ Zytokin in der Lage, über zwei Rezeptorkomplexe (gp130/LIFR und gp130/OSMR) zu signalisieren. OSM induziert sowohl die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges, als auch der Ras/Raf/MAPK-Kaskade. Die zusätzliche starke Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5 bereits bei niedrigen Zytokinkonzentrationen stellt eine Besonderheit der OSM-vermittelten Signaltransduktion dar.

Die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit zeigen, dass humaner und muriner OSMR evolutionär unterschiedliche Mechanismen zur STAT5-Phosphorylierung nutzen. Der humane Rezeptor nutzt ein STAT5-Rekrutierungsmotiv (Y₈₃₇/Y₈₃₉), das

C-terminal von der Box1/2-Region gelegen ist und im murinen Rezeptor fehlt. Im Gegensatz dazu aktiviert der murine OSMR STAT5 direkt über rezeptorassoziierte Janus Kinasen. Dabei rekrutiert er präferentiell JAK2, während der humane Rezeptor eine höhere Affinität für JAK1 besitzt. Eine einzelne Aminosäure (F₈₂₀) im humanen OSMR ist für diese Präferenz verantwortlich. Zusätzlich belegen die in diesem Teil erhaltenen Ergebnisse eine evolutionär konservierte, tyrosinunabhängige STAT1-Aktivierung direkt über die rezeptorassoziierten Janus Kinasen. Die OSM-induzierte STAT3-Phosphorylierung erfolgt über die zwei C-terminalen Tyrosinreste Y₉₁₇ und Y₉₄₅.

Bislang beschreiben nur wenige Publikationen die biochemischen Zusammenhänge zwischen OSM, der Expression von Chemokinen und den daraus folgenden physiologischen Konsequenzen. Die Rekrutierung von Leukozyten ins verletzte Gewebe aber stellt einen initialen Schritt

inflammatorischer Antworten dar und ist darüberhinaus auch für die Immunabwehr des Organismus von sich ausbreitenden Tumoren unverzichtbar.

Der zweite Teil dieser Arbeit zeigt, dass OSM befähigt ist, in einem deutlich früheren Zeitrahmen als die bekannten proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α die Expression von CCL1, CCL7 und CCL8 zu induzieren. Die physiologische Relevanz dieser Chemokine wird durch die Migration von primären Monozyten und T-Lymphozyten belegt. Für die verstärkte Expression von CCL1 und CCL8 sind die MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 verantwortlich. Während ERK1/2 die Transkription der Chemokine induziert, ist p38 über einen Tristetraprolin destabilisierenden Mechanismus an der Stabilisierung der Chemokin-mRNA beteiligt. Darüberhinaus wird die Expression von CCL1 durch aktiviertes STAT5 negativ reguliert, wobei nicht STAT5 selbst, sondern sein Zielgen CIS den supprimierenden Effekt bewirkt. Diese Form der Negativregulation findet sich auch bei Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen, bei denen durch eine JAK2-Mutation (V₆₁₇F) dauerhaft aktiviertes STAT5 und damit dauerhaft synthetisiertes CIS die Expression von CCL1 supprimiert.

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine schwerwiegende, chronische Erkrankung, die in Folge von inflammatorischen Immunantworten sowohl zu dauerhaften Gelenksschädigungen, als auch zu extraartikulären Symptomen führt. Der tatsächliche Auslöser und der pathologische Verlauf der rheumatoiden Arthritis sind bislang nur unvollständig erforscht, wenngleich bekannt ist, dass es u. a. im komplexen Zusammenspiel diverser Zytokine zu grundlegenden Dysregulationen kommt.

Der dritte Teil dieser Arbeit belegt, dass trotz der Vielzahl von verschiedenen Zytokinen, die man in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten findet, nur OSM befähigt ist, eine verlängerte Expression des Chemokins CCL13 zu induzieren. Dabei ist die OSM-vermittelte CCL13-Expression gewebespezifisch, da weder Haut-, noch Lungen- oder Cervixfibroblasten dieses Chemokin exprimieren. Dagegen wird CCL13 von synovialen Fibroblasten gesunder und kranker Spender über einen STAT5-abhängigen Signalweg exprimiert. Zusätzlich sind die MAPK

ERK1/2 und p38 an der Transkription und mRNA-Stabilisierung von CCL13 beteiligt und fördern letztlich in Kombination mit STAT5 die CCL13-abhängige Migration von Monozyten.

Lediglich vereinzelte Publikationen weisen bislang darauf hin, dass neben den Typ-I Interferonen, die zweifelsfrei als Schlüsselzytokine im Verlauf einer antiviralen Immunantwort angesehen werden können, auch die die adaptive Immunantwort steuernden, inflammatorischen Zytokine befähigt sind, direkten Einfluss auf den Ablauf der antiviralen Abwehr zu nehmen.

Die Ergebnisse im vierten Teil dieser Arbeit zeigen, dass das IL-6-Typ Zytokin OSM befähigt ist, die erst innerhalb der letzten Jahre neu entdeckten DExD/H-Box Helikasen RIG-I und MDA5 zu induzieren. Die Expression dieser Helikasen erfolgt innerhalb von einer Stunde während der OSM-Stimulation, wird über den OSMR vermittelt und ist von einer STAT1-Serin- und gleichzeitigen STAT1-Tyrosinphosphorylierung abhängig. Während OSM selbst keine antivirale Aktivität besitzt, ist es dennoch durch die Induktion von RIG-I und MDA5 und einer resultierenden, potentiell beschleunigten IFN β -Produktion befähigt, humane Lungenfibroblasten bei einer viralen Infektion zu schützen. Die Tatsache, dass das Matrixprotein des *vesicular stomatitis virus* (VSV) die OSM-induzierte Expression der Helikasen unterbindet, unterstreicht die physiologische Relevanz dieses *priming*-Effekts.

VI.2 Summary

Oncostatin M (OSM) belongs to the IL-6-type cytokine family, comprising nine family members so far. All IL-6-type cytokines are characterized by transferring their signals through the common receptor chain gp130. OSM, mainly secreted by activated T-Lymphocytes, macrophages and neutrophils, is the only one able to signal via two different receptor complexes - gp130/LIFR (type I receptor complex) and gp130/OSMR (type II receptor complex). OSM initiates both the JAK/STAT-pathway and the Ras/Raf/MAPK-cascade. One peculiarity of OSM-signalling is the

additional strong activation of STAT5 even in the presence of little amounts of OSM.

The results in the first part of this thesis demonstrate that the human and murine OSM receptors use distinct mechanisms for STAT5 activation. The human receptor contains a STAT5 recruiting tyrosine motif (Y₈₃₇/Y₈₃₉) C-terminal to the box1/2 region which is absent in the mouse receptor. In contrast, the murine receptor initiates STAT5 activation directly via the receptor bound Janus kinases. Intriguingly, the murine receptor preferentially recruits JAK2 while the human receptor seems to have a higher affinity for JAK1. A single amino acid (F₈₂₀) in the human receptor is responsible for this preference. Furthermore, the results of the first section give proof that the OSM-induced STAT1 phosphorylation occurs independently of receptor tyrosine motifs and is mediated directly by Janus kinases whilst the activation of STAT3 is dependent on the two C-terminally located tyrosine residues Y₉₁₇/Y₉₄₅ of the OSMR.

So far only a few publications describe the biochemical connection between OSM, the expression of chemokines and the resulting physiological consequences. The recruitment of leukocytes into injured tissue is an initial step of inflammatory responses and is even important for the host's immune defense against tumors.

The second part of this thesis illustrates, that OSM stimulates the expression of the chemokines CCL1, CCL7 and CCL8 with a faster kinetic than IL-1 β or TNF α . The physiological relevance of the induced chemokines is highlighted by the migration of primary monocytes and T-lymphocytes. The mitogen-activated protein kinases (MAPKs) ERK1/2 and p38 are crucial factors for the enhanced expression of CCL1 and CCL8. Depletion of the ERK1/2 target genes c-Fos and c-Jun strongly decreases CCL1 and CCL8 expression, while p38 MAPK prolongs the half-life of analyzed chemokines. Additionally, the gene expression of CCL1 is negatively regulated by STAT5. Importantly, not STAT5 itself, but its target gene CIS is required for the STAT5 inhibitory effect on CCL1 expression. Final experiments show that the constitutive activation of STAT5 by a mutated form of JAK2 (JAK V₆₁₇F) occurring in patients with myeloproliferative disorders similarly suppresses CCL1 expression.

Rheumatoid arthritis (RA) is a severe, chronic disease characterized by a profound inflammatory response that leads to joint destruction as well as extraarticular symptoms bearing a significant impact on both morbidity and mortality. The cause and pathologic processes underlying RA have not yet been fully elucidated. However, it is clear that both the cellular immune system and the cytokine network are subject to profound dysregulations.

The third part of this thesis contains experiments to further evaluate the role of OSM in this context. Among a number of cytokines present in the synovial fluid of RA patients, only OSM induces a strong, prolonged expression of CCL13. The expression of CCL13 appears to be tissue-specific since neither in dermal nor lung or cervix fibroblasts CCL13 expression could be observed. In contrast, CCL13 induction in synovial fibroblasts from both healthy donors and RA patients is mediated via a STAT5 dependent signalling pathway. Furthermore, the MAP kinases ERK1/2 and p38 promote both transcription and mRNA stability of CCL13 and in combination with STAT5 finally lead to the CCL13 dependent migration of monocytes.

Only a few publications hint to the fact that besides the type-I-interferons as key-cytokines within the antiviral response, proinflammatory cytokines regulating the adaptive immune system could also be able to exert an influence on the mechanisms of antiviral defense.

The results of the fourth part of this thesis show that the IL-6-type cytokine OSM is a potent inducer of the recently discovered helicases RIG-I and MDA5. The OSMR-mediated expression of these helicases occurs at early time points and is dependent on both tyrosine and serine phosphorylated STAT1. While OSM does not have any obvious antiviral activity itself, it very significantly protects human fibroblasts against viral infection by induction of RIG-I and MDA5, therefore accelerating the IFN β production. Importantly, transfection of the M-protein of the vesicular stomatitis virus (VSV) can inhibit the OSM-induced production of RIG-I and MDA5 and therefore underlines the physiological significance of this priming mechanism.

VII. Literatur

1. Heinrich, P. C., Castell, J. V., and Andus, T. (1990) *Biochem J* **265**, 621-636
2. Okada, M., Kitahara, M., Kishimoto, S., Matsuda, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1988) *J Immunol* **141**, 1543-1549
3. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998) *Biochem J* **334 (Pt 2)**, 297-314
4. Derouet, D., Rousseau, F., Alfonsi, F., Froger, J., Hermann, J., Barbier, F., Perret, D., Diveu, C., Guillet, C., Preisser, L., Dumont, A., Barbado, M., Morel, A., deLapeyriere, O., Gascan, H., and Chevalier, S. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4827-4832
5. Senaldi, G., Varnum, B. C., Sarmiento, U., Starnes, C., Lile, J., Scully, S., Guo, J., Elliott, G., McNinch, J., Shaklee, C. L., Freeman, D., Manu, F., Simonet, W. S., Boone, T., and Chang, M. S. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11458-11463
6. Pflanz, S., Timans, J. C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Wagner, J. L., To, W., Zurawski, S., McClanahan, T. K., Gorman, D. M., Bazan, J. F., de Waal Malefyt, R., Rennick, D., and Kastelein, R. A. (2002) *Immunity* **16**, 779-790
7. Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., David, M., Fabra, R., Trullenque, R., and Heinrich, P. C. (1990) *Hepatology* **12**, 1179-1186
8. Peters, M., Roeb, E., Pennica, D., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Rose-John, S. (1995) *FEBS Lett* **372**, 177-180
9. Richards, C. D., Brown, T. J., Shoyab, M., Baumann, H., and Gauldie, J. (1992) *J Immunol* **148**, 1731-1736
10. Baumann, H., and Wong, G. G. (1989) *J Immunol* **143**, 1163-1167
11. Schooltink, H., Stoyan, T., Roeb, E., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1992) *FEBS Lett* **314**, 280-284
12. Andus, T., Geiger, T., Hirano, T., Northoff, H., Ganter, U., Bauer, J., Kishimoto, T., and Heinrich, P. C. (1987) *FEBS Lett* **221**, 18-22
13. Hirano, T. (1998) *Int Rev Immunol* **16**, 249-284
14. Jansen, J. H., Kluin-Nelemans, J. C., Van Damme, J., Wientjens, G. J., Willemze, R., and Fibbe, W. E. (1992) *J Exp Med* **175**, 1151-1154
15. Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., and et al. (1986) *Nature* **324**, 73-76
16. Bazan, J. F. (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6934-6938
17. Davis, S., Aldrich, T. H., Valenzuela, D. M., Wong, V. V., Furth, M. E., Squinto, S. P., and Yancopoulos, G. D. (1991) *Science* **253**, 59-63
18. Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1988) *Science* **241**, 825-828
19. Hilton, D. J., Hilton, A. A., Raicevic, A., Rakar, S., Harrison-Smith, M., Gough, N. M., Begley, C. G., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Willson, T. A. (1994) *Embo J* **13**, 4765-4775
20. Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., and Kishimoto, T. (1990) *Cell* **63**, 1149-1157
21. Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993) *Science* **260**, 1808-1810
22. Yin, T., Taga, T., Tsang, M. L., Yasukawa, K., Kishimoto, T., and Yang, Y. C. (1993) *J Immunol* **151**, 2555-2561
23. Vlotides, G., Zitzmann, K., Stalla, G. K., and Auernhammer, C. J. (2004) *Cytokine Growth Factor Rev* **15**, 325-336
24. Elson, G. C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., Suard, I., de Coignac, A. B., Delneste, Y., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F., and Gascan, H. (2000) *Nat Neurosci* **3**, 867-872
25. Robledo, O., Fourcin, M., Chevalier, S., Guillet, C., Auguste, P., Pouplard-Barthelaix, A., Pennica, D., and Gascan, H. (1997) *J Biol Chem* **272**, 4855-4863
26. Gearing, D. P., Comeau, M. R., Friend, D. J., Gimpel, S. D., Thut, C. J., McGourty, J., Brasher, K. K., King, J. A., Gillis, S., Mosley, B., and et al. (1992) *Science* **255**, 1434-1437
27. Ichihara, M., Hara, T., Kim, H., Murate, T., and Miyajima, A. (1997) *Blood* **90**, 165-173

-
28. Mosley, B., De Imus, C., Friend, D., Boiani, N., Thoma, B., Park, L. S., and Cosman, D. (1996) *J Biol Chem* **271**, 32635-32643
 29. Lindberg, R. A., Juan, T. S., Welcher, A. A., Sun, Y., Cupples, R., Guthrie, B., and Fletcher, F. A. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 3357-3367
 30. Villarino, A. V., and Hunter, C. A. (2004) *Arthritis Res Ther* **6**, 225-233
 31. Ghilardi, N., Li, J., Hongo, J. A., Yi, S., Gurney, A., and de Sauvage, F. J. (2002) *J Biol Chem* **277**, 16831-16836
 32. Dillon, S. R., Sprecher, C., Hammond, A., Billsborough, J., Rosenfeld-Franklin, M., Presnell, S. R., Haugen, H. S., Maurer, M., Harder, B., Johnston, J., Bort, S., Mudri, S., Kuijper, J. L., Bukowski, T., Shea, P., Dong, D. L., Dasovich, M., Grant, F. J., Lockwood, L., Levin, S. D., LeCiel, C., Waggle, K., Day, H., Topouzis, S., Kramer, J., Kuestner, R., Chen, Z., Foster, D., Parrish-Novak, J., and Gross, J. A. (2004) *Nat Immunol* **5**, 752-760
 33. Mullberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Gunther, M., Graeve, L., Buse, G., Mackiewicz, A., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1993) *Eur J Immunol* **23**, 473-480
 34. Lust, J. A., Donovan, K. A., Kline, M. P., Greipp, P. R., Kyle, R. A., and Maihle, N. J. (1992) *Cytokine* **4**, 96-100
 35. Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1989) *Cell* **58**, 573-581
 36. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. (2003) *Biochem J* **374**, 1-20
 37. Kurth, I., Horsten, U., Pflanz, S., Dahmen, H., Kuster, A., Grotzinger, J., Heinrich, P. C., and Muller-Newen, G. (1999) *J Immunol* **162**, 1480-1487
 38. Timmermann, A., Pflanz, S., Grotzinger, J., Kuster, A., Kurth, I., Pitard, V., Heinrich, P. C., and Muller-Newen, G. (2000) *FEBS Lett* **468**, 120-124
 39. Grotzinger, J., Kernebeck, T., Kallen, K. J., and Rose-John, S. (1999) *Biol Chem* **380**, 803-813
 40. Luticken, C., Wegenka, U. M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A. G., Wilks, A. F., Yasukawa, K., Taga, T., and et al. (1994) *Science* **263**, 89-92
 41. Stahl, N., Boulton, T. G., Farruggella, T., Ip, N. Y., Davis, S., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S., and et al. (1994) *Science* **263**, 92-95
 42. Haan, C., Hermanns, H. M., Heinrich, P. C., and Behrmann, I. (2000) *Biochem J* **349**, 261-266
 43. Pellegrini, S., and Dusanter-Fourt, I. (1997) *Eur J Biochem* **248**, 615-633
 44. Wilks, A. F., Harpur, A. G., Kurban, R. R., Ralph, S. J., Zurcher, G., and Ziemiecki, A. (1991) *Mol Cell Biol* **11**, 2057-2065
 45. Harpur, A. G., Andres, A. C., Ziemiecki, A., Aston, R. R., and Wilks, A. F. (1992) *Oncogene* **7**, 1347-1353
 46. Takahashi, T., and Shirasawa, T. (1994) *FEBS Lett* **342**, 124-128
 47. Firmbach-Kraft, I., Byers, M., Shows, T., Dalla-Favera, R., and Krolewski, J. J. (1990) *Oncogene* **5**, 1329-1336
 48. Duhe, R. J., and Farrar, W. L. (1998) *J Interferon Cytokine Res* **18**, 1-15
 49. Velazquez, L., Mogensen, K. E., Barbieri, G., Fellous, M., Uze, G., and Pellegrini, S. (1995) *J Biol Chem* **270**, 3327-3334
 50. Saharinen, P., Takaluoma, K., and Silvennoinen, O. (2000) *Mol Cell Biol* **20**, 3387-3395
 51. Saharinen, P., Vihinen, M., and Silvennoinen, O. (2003) *Mol Biol Cell* **14**, 1448-1459
 52. Haan, C., Is'harc, H., Hermanns, H. M., Schmitz-Van De Leur, H., Kerr, I. M., Heinrich, P. C., Grotzinger, J., and Behrmann, I. (2001) *J Biol Chem* **276**, 37451-37458
 53. Narazaki, M., Witthuhn, B. A., Yoshida, K., Silvennoinen, O., Yasukawa, K., Ihle, J. N., Kishimoto, T., and Taga, T. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2285-2289
 54. Hermanns, H. M., Radtke, S., Haan, C., Schmitz-Van de Leur, H., Tavernier, J., Heinrich, P. C., and Behrmann, I. (1999) *J Immunol* **163**, 6651-6658
 55. Guschin, D., Rogers, N., Briscoe, J., Witthuhn, B., Watling, D., Horn, F., Pellegrini, S., Yasukawa, K., Heinrich, P., Stark, G. R., and et al. (1995) *Embo J* **14**, 1421-1429
 56. Schaper, F., Gendo, C., Eck, M., Schmitz, J., Grimm, C., Anhof, D., Kerr, I. M., and Heinrich, P. C. (1998) *Biochem J* **335 (Pt 3)**, 557-565
 57. Matsuda, T., Takahashi-Tezuka, M., Fukada, T., Okuyama, Y., Fujitani, Y., Tsukada, S., Mano, H., Hirai, H., Witte, O. N., and Hirano, T. (1995) *Blood* **85**, 627-633

-
58. Matsuda, T., Fukada, T., Takahashi-Tezuka, M., Okuyama, Y., Fujitani, Y., Hanazono, Y., Hirai, H., and Hirano, T. (1995) *J Biol Chem* **270**, 11037-11039
 59. Gauzzi, M. C., Barbieri, G., Richter, M. F., Uze, G., Ling, L., Fellous, M., and Pellegrini, S. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11839-11844
 60. Huang, L. J., Constantinescu, S. N., and Lodish, H. F. (2001) *Mol Cell* **8**, 1327-1338
 61. Radtke, S., Hermanns, H. M., Haan, C., Schmitz-Van De Leur, H., Gascan, H., Heinrich, P. C., and Behrmann, I. (2002) *J Biol Chem* **277**, 11297-11305
 62. Ragimbeau, J., Dondi, E., Alcover, A., Eid, P., Uze, G., and Pellegrini, S. (2003) *Embo J* **22**, 537-547
 63. Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell, J. E., Jr., and Yancopoulos, G. D. (1995) *Science* **267**, 1349-1353
 64. Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (1996) *J Biol Chem* **271**, 12991-12998
 65. Fuhrer, D. K., Feng, G. S., and Yang, Y. C. (1995) *J Biol Chem* **270**, 24826-24830
 66. Shuai, K. (1999) *Prog Biophys Mol Biol* **71**, 405-422
 67. Wegenka, U. M., Buschmann, J., Luttkien, C., Heinrich, P. C., and Horn, F. (1993) *Mol Cell Biol* **13**, 276-288
 68. Kuropatwinski, K. K., De Imus, C., Gearing, D., Baumann, H., and Mosley, B. (1997) *J Biol Chem* **272**, 15135-15144
 69. Wang, Y., Robledo, O., Kinzie, E., Blanchard, F., Richards, C., Miyajima, A., and Baumann, H. (2000) *J Biol Chem* **275**, 25273-25285
 70. Kaptein, A., Paillard, V., and Saunders, M. (1996) *J Biol Chem* **271**, 5961-5964
 71. Shuai, K., Stark, G. R., Kerr, I. M., and Darnell, J. E., Jr. (1993) *Science* **261**, 1744-1746
 72. Abe, K., Hirai, M., Mizuno, K., Higashi, N., Sekimoto, T., Miki, T., Hirano, T., and Nakajima, K. (2001) *Oncogene* **20**, 3464-3474
 73. Uddin, S., Sassano, A., Deb, D. K., Verma, A., Majchrzak, B., Rahman, A., Malik, A. B., Fish, E. N., and Plataniias, L. C. (2002) *J Biol Chem* **277**, 14408-14416
 74. Haq, R., Halupa, A., Beattie, B. K., Mason, J. M., Zanke, B. W., and Barber, D. L. (2002) *J Biol Chem* **277**, 17359-17366
 75. Jain, N., Zhang, T., Fong, S. L., Lim, C. P., and Cao, X. (1998) *Oncogene* **17**, 3157-3167
 76. Fukada, T., Hibi, M., Yamanaka, Y., Takahashi-Tezuka, M., Fujitani, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K., and Hirano, T. (1996) *Immunity* **5**, 449-460
 77. Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 4109-4117
 78. Zhang, X. F., Settleman, J., Kyriakis, J. M., Takeuchi-Suzuki, E., Elledge, S. J., Marshall, M. S., Bruder, J. T., Rapp, U. R., and Avruch, J. (1993) *Nature* **364**, 308-313
 79. Avruch, J., Zhang, X. F., and Kyriakis, J. M. (1994) *Trends Biochem Sci* **19**, 279-283
 80. Hermanns, H. M., Radtke, S., Schaper, F., Heinrich, P. C., and Behrmann, I. (2000) *J Biol Chem* **275**, 40742-40748
 81. Boing, I., Stross, C., Radtke, S., Lippok, B. E., Heinrich, P. C., and Hermanns, H. M. (2006) *Cell Signal* **18**, 50-61
 82. Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Hilton, D. J. (1997) *Nature* **387**, 917-921
 83. Endo, T. A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiya, S., and Yoshimura, A. (1997) *Nature* **387**, 921-924
 84. Narazaki, M., Fujimoto, M., Matsumoto, T., Morita, Y., Saito, H., Kajita, T., Yoshizaki, K., Naka, T., and Kishimoto, T. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13130-13134
 85. Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., Ohtsuka, S., Imaizumi, T., Matsuda, T., Ihle, J. N., and Yoshimura, A. (1999) *Embo J* **18**, 1309-1320
 86. Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S., Syoda, T., Kinjyo, I., Sasaki, M., Johnston, J. A., and Yoshimura, A. (1999) *Genes Cells* **4**, 339-351
 87. Zhang, J. G., Metcalf, D., Rakar, S., Asimakis, M., Greenhalgh, C. J., Willson, T. A., Starr, R., Nicholson, S. E., Carter, W., Alexander, W. S., Hilton, D. J., and Nicola, N. A. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13261-13265

-
88. Ungureanu, D., Saharinen, P., Junttila, I., Hilton, D. J., and Silvennoinen, O. (2002) *Mol Cell Biol* **22**, 3316-3326
 89. Frantsve, J., Schwaller, J., Sternberg, D. W., Kutok, J., and Gilliland, D. G. (2001) *Mol Cell Biol* **21**, 3547-3557
 90. De Sepulveda, P., Ilangumaran, S., and Rottapel, R. (2000) *J Biol Chem* **275**, 14005-14008
 91. Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S., and White, M. F. (2002) *J Biol Chem* **277**, 42394-42398
 92. Stross, C., Radtke, S., Clahsen, T., Gerlach, C., Volkmer-Engert, R., Schaper, F., Heinrich, P. C., and Hermans, H. M. (2006) *J Biol Chem* **281**, 8458-8468
 93. Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997) *Science* **278**, 1803-1805
 94. Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D., and Shuai, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10626-10631
 95. Ohtani, T., Ishihara, K., Atsumi, T., Nishida, K., Kaneko, Y., Miyata, T., Itoh, S., Narimatsu, M., Maeda, H., Fukada, T., Itoh, M., Okano, H., Hibi, M., and Hirano, T. (2000) *Immunity* **12**, 95-105
 96. Lehmann, U., Schmitz, J., Weissenbach, M., Sobota, R. M., Hortner, M., Friederichs, K., Behrmann, I., Tsiaris, W., Sasaki, A., Schneider-Mergener, J., Yoshimura, A., Neel, B. G., Heinrich, P. C., and Schaper, F. (2003) *J Biol Chem* **278**, 661-671
 97. Baggiolini, M. (2001) *J Intern Med* **250**, 91-104
 98. Baggiolini, M. (1998) *Nature* **392**, 565-568
 99. Baggiolini, M. (2004) *Ernst Schering Res Found Workshop*, 1-9
 100. Baggiolini, M. (2000) *Immunol Rev* **177**, 5-7
 101. Rollins, B. J. (1997) *Blood* **90**, 909-928
 102. Baggiolini, M., and Loetscher, P. (2000) *Immunol Today* **21**, 418-420
 103. Porter, J. D., Guo, W., Merriam, A. P., Khanna, S., Cheng, G., Zhou, X., Andrade, F. H., Richmonds, C., and Kaminski, H. J. (2003) *Neuromuscul Disord* **13**, 223-235
 104. Corcione, A., Tortolina, G., Bonecchi, R., Battilana, N., Taborelli, G., Malavasi, F., Sozzani, S., Ottonello, L., Dallegri, F., and Pistoia, V. (2002) *Int Immunol* **14**, 883-892
 105. Romagnani, S. (2002) *Mol Immunol* **38**, 881-885
 106. Weber, M., Uguccioni, M., Ochensberger, B., Baggiolini, M., Clark-Lewis, I., and Dahinden, C. A. (1995) *J Immunol* **154**, 4166-4172
 107. Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hebert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J., and Power, C. A. (2000) *Pharmacol Rev* **52**, 145-176
 108. Bacon, K., Baggiolini, M., Broxmeyer, H., Horuk, R., Lindley, I., Mantovani, A., Maysushima, K., Murphy, P., Nomiyama, H., Oppenheim, J., Rot, A., Schall, T., Tsang, M., Thorpe, R., Van Damme, J., Wadhwa, M., Yoshie, O., Zlotnik, A., and Zoon, K. (2002) *J Interferon Cytokine Res* **22**, 1067-1068
 109. Uguccioni, M., D'Apuzzo, M., Loetscher, M., Dewald, B., and Baggiolini, M. (1995) *Eur J Immunol* **25**, 64-68
 110. Van Damme, J., Proost, P., Lenaerts, J. P., and Opdenakker, G. (1992) *J Exp Med* **176**, 59-65
 111. Alam, R., Forsythe, P., Stafford, S., Heinrich, J., Bravo, R., Proost, P., and Van Damme, J. (1994) *J Immunol* **153**, 3155-3159
 112. Langdon, C., Kerr, C., Tong, L., and Richards, C. D. (2003) *J Immunol* **170**, 548-555
 113. Lin, S. K., Kok, S. H., Yeh, F. T., Kuo, M. Y., Lin, C. C., Wang, C. C., Goldring, S. R., and Hong, C. Y. (2004) *Arthritis Rheum* **50**, 785-793
 114. Hartner, A., Goppelt-Struebe, M., Hocke, G. M., and Sterzel, R. B. (1997) *Kidney Int* **51**, 1754-1760
 115. Lee, M. J., Song, H. Y., Kim, M. R., Sung, S. M., Jung, J. S., and Kim, J. H. (2007) *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 650-659
 116. Fritz, D. K., Kerr, C., Tong, L., Smyth, D., and Richards, C. D. (2006) *J Immunol* **176**, 4352-4360
 117. Faffe, D. S., Flynt, L., Mellema, M., Moore, P. E., Silverman, E. S., Subramaniam, V., Jones, M. R., Mizgerd, J. P., Whitehead, T., Imrich, A., Panettieri, R. A., Jr., and Shore, S. A. (2005) *J Allergy Clin Immunol* **115**, 514-520

-
118. Modur, V., Feldhaus, M. J., Weyrich, A. S., Jicha, D. L., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., and McIntyre, T. M. (1997) *J Clin Invest* **100**, 158-168
 119. Kerfoot, S. M., Raharjo, E., Ho, M., Kaur, J., Serirom, S., McCafferty, D. M., Burns, A. R., Patel, K. D., and Kubes, P. (2001) *Am J Pathol* **159**, 1531-1539
 120. Hurst, S. M., McLoughlin, R. M., Monslow, J., Owens, S., Morgan, L., Fuller, G. M., Topley, N., and Jones, S. A. (2002) *J Immunol* **169**, 5244-5251
 121. Kawai, T., and Akira, S. (2006) *Nat Immunol* **7**, 131-137
 122. Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C. S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., and Akira, S. (2006) *Nature* **441**, 101-105
 123. Sehgal, P. B., and Sagar, A. D. (1980) *Nature* **288**, 95-97
 124. Weissenbach, J., Chernajovsky, Y., Zeevi, M., Shulman, L., Soreq, H., Nir, U., Wallach, D., Perricaudet, M., Tiollais, P., and Revel, M. (1980) *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7152-7156
 125. Zilberstein, A., Ruggieri, R., Korn, J. H., and Revel, M. (1986) *Embo J* **5**, 2529-2537
 126. Hirano, T., Matsuda, T., Hosoi, K., Okano, A., Matsui, H., and Kishimoto, T. (1988) *Immunol Lett* **17**, 41-45
 127. Reis, L. F., Le, J. M., Hirano, T., Kishimoto, T., and Vilcek, J. (1988) *J Immunol* **140**, 1566-1570
 128. Gazel, A., Rosdy, M., Bertino, B., Tornier, C., Sahuc, F., and Blumenberg, M. (2006) *J Invest Dermatol* **126**, 2647-2657
 129. Langdon, C., Leith, J., Smith, F., and Richards, C. D. (1997) *Arthritis Rheum* **40**, 2139-2146
 130. Arcone, R., Pucci, P., Zappacosta, F., Fontaine, V., Malorni, A., Marino, G., and Ciliberto, G. (1991) *Eur J Biochem* **198**, 541-547
 131. Weiergraber, O., Hemmann, U., Kuster, A., Muller-Newen, G., Schneider, J., Rose-John, S., Kurschat, P., Brakenhoff, J. P., Hart, M. H., Stabel, S., and et al. (1995) *Eur J Biochem* **234**, 661-669
 132. Anhuf, D., Weissenbach, M., Schmitz, J., Sobota, R., Hermanns, H. M., Radtke, S., Linnemann, S., Behrmann, I., Heinrich, P. C., and Schaper, F. (2000) *J Immunol* **165**, 2535-2543
 133. Dreuw, A., Radtke, S., Pflanz, S., Lippok, B. E., Heinrich, P. C., and Hermanns, H. M. (2004) *J Biol Chem* **279**, 36112-36120
 134. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467
 135. Bradford, M. M. (1976) *Anal Biochem* **72**, 248-254
 136. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
 137. Vernallis, A. B., Hudson, K. R., and Heath, J. K. (1997) *J Biol Chem* **272**, 26947-26952
 138. Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Moser, B. (1994) *Faseb J* **8**, 1055-1060
 139. Miller, M. D., and Krangel, M. S. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2950-2954
 140. Schaeferli, P., Ebert, L., Willmann, K., Blaser, A., Roos, R. S., Loetscher, P., and Moser, B. (2004) *J Exp Med* **199**, 1265-1275
 141. Pye, J. L., Dupont, L. J., Menten, P., Van Coillie, E., Opdenakker, G., Van Damme, J., Chung, K. F., Demedts, M. G., and Verleden, G. M. (1999) *Am J Respir Cell Mol Biol* **21**, 528-536
 142. Struyf, S., Van Collie, E., Paemen, L., Put, W., Lenaerts, J. P., Proost, P., Opdenakker, G., and Van Damme, J. (1998) *J Leukoc Biol* **63**, 364-372
 143. Selvan, R. S., Zhou, L. J., and Krangel, M. S. (1997) *Eur J Immunol* **27**, 687-694
 144. Hintzen, C., Evers, C., Lippok, B. E., Volkmer, R., Heinrich, P. C., Radtke, S., and Hermanns, H. M. (2008) *J Biol Chem* **283**, 19465-19477
 145. Fujitani, Y., Hibi, M., Fukada, T., Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, H., Yamaguchi, T., Sugiyama, K., Yamanaka, Y., Nakajima, K., and Hirano, T. (1997) *Oncogene* **14**, 751-761
 146. Levine, R. L., Pardanani, A., Tefferi, A., and Gilliland, D. G. (2007) *Nat Rev Cancer* **7**, 673-683
 147. Iwamoto, T., Okamoto, H., Iikuni, N., Takeuchi, M., Toyama, Y., Tomatsu, T., Kamatani, N., and Momohara, S. (2006) *Rheumatology (Oxford)* **45**, 421-424
 148. Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004) *Nat Immunol* **5**, 730-737

-
149. Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M., Endres, S., and Hartmann, G. (2006) *Science* **314**, 994-997
 150. Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005) *Immunity* **23**, 19-28
 151. Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F., and Reis e Sousa, C. (2006) *Science* **314**, 997-1001
 152. Imaizumi, T., Aratani, S., Nakajima, T., Carlson, M., Matsumiya, T., Tanji, K., Ookawa, K., Yoshida, H., Tsuchida, S., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., and Satoh, K. (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 274-279
 153. Kubota, K., Sakaki, H., Imaizumi, T., Nakagawa, H., Kusumi, A., Kobayashi, W., Satoh, K., and Kimura, H. (2006) *Oral Microbiol Immunol* **21**, 399-406
 154. Kang, D. C., Gopalkrishnan, R. V., Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A. M., and Fisher, P. B. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 637-642
 155. Imaizumi, T., Kumagai, M., Taima, K., Fujita, T., Yoshida, H., and Satoh, K. (2005) *Eur Respir J* **25**, 1077-1083
 156. Imaizumi, T., Yagihashi, N., Hatakeyama, M., Yamashita, K., Ishikawa, A., Taima, K., Yoshida, H., Yagihashi, S., and Satoh, K. (2004) *Tohoku J Exp Med* **203**, 313-318
 157. Sergerie, Y., Rivest, S., and Boivin, G. (2007) *J Infect Dis* **196**, 853-860
 158. Decker, T., and Kovarik, P. (2000) *Oncogene* **19**, 2628-2637
 159. Terstegen, L., Gatsios, P., Ludwig, S., Pleschka, S., Jahnen-Dechent, W., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (2001) *J Immunol* **167**, 5209-5216
 160. May, P., Gerhartz, C., Heesel, B., Welte, T., Doppler, W., Graeve, L., Horn, F., and Heinrich, P. C. (1996) *FEBS Lett* **394**, 221-226
 161. Smit, L. S., Meyer, D. J., Billestrup, N., Norstedt, G., Schwartz, J., and Carter-Su, C. (1996) *Mol Endocrinol* **10**, 519-533
 162. Sotiropoulos, A., Moutoussamy, S., Renaudie, F., Clauss, M., Kayser, C., Gouilleux, F., Kelly, P. A., and Finidori, J. (1996) *Mol Endocrinol* **10**, 998-1009
 163. Wang, X., Darus, C. J., Xu, B. C., and Kopchick, J. J. (1996) *Mol Endocrinol* **10**, 1249-1260
 164. Gobert, S., Chretien, S., Gouilleux, F., Muller, O., Pallard, C., Dusanter-Fourt, I., Groner, B., Lacombe, C., Gisselbrecht, S., and Mayeux, P. (1996) *Embo J* **15**, 2434-2441
 165. Damen, J. E., Wakao, H., Miyajima, A., Krosli, J., Humphries, R. K., Cutler, R. L., and Krystal, G. (1995) *Embo J* **14**, 5557-5568
 166. Quelle, F. W., Wang, D., Nosaka, T., Thierfelder, W. E., Stravopodis, D., Weinstein, Y., and Ihle, J. N. (1996) *Mol Cell Biol* **16**, 1622-1631
 167. Beadling, C., Ng, J., Babbage, J. W., and Cantrell, D. A. (1996) *Embo J* **15**, 1902-1913
 168. Pezet, A., Ferrag, F., Kelly, P. A., and Edery, M. (1997) *J Biol Chem* **272**, 25043-25050
 169. Schwaller, J., Frantsve, J., Aster, J., Williams, I. R., Tomasson, M. H., Ross, T. S., Peeters, P., Van Rompaey, L., Van Etten, R. A., Ilaria, R., Jr., Marynen, P., and Gilliland, D. G. (1998) *Embo J* **17**, 5321-5333
 170. Lacronique, V., Boureux, A., Valle, V. D., Poiriel, H., Quang, C. T., Mauchauffe, M., Berthou, C., Lessard, M., Berger, R., Ghysdael, J., and Bernard, O. A. (1997) *Science* **278**, 1309-1312
 171. Peeters, P., Raynaud, S. D., Cools, J., Wlodarska, I., Grosgeorge, J., Philip, P., Monpoux, F., Van Rompaey, L., Baens, M., Van den Berghe, H., and Marynen, P. (1997) *Blood* **90**, 2535-2540
 172. Nakamura, N., Chin, H., Miyasaka, N., and Miura, O. (1996) *J Biol Chem* **271**, 19483-19488
 173. Gupta, S., Yan, H., Wong, L. H., Ralph, S., Krolewski, J., and Schindler, C. (1996) *Embo J* **15**, 1075-1084
 174. Haan, S., Keller, J. F., Behrmann, I., Heinrich, P. C., and Haan, C. (2005) *Cell Signal* **17**, 1542-1550
 175. Gerard, C., and Rollins, B. J. (2001) *Nat Immunol* **2**, 108-115
 176. Mackay, C. R. (2001) *Nat Immunol* **2**, 95-101
 177. Miller, M. D., Wilson, S. D., Dorf, M. E., Seuanez, H. N., O'Brien, S. J., and Krangel, M. S. (1990) *J Immunol* **145**, 2737-2744
 178. Cantor, J., and Haskins, K. (2007) *J Immunol* **179**, 5760-5767

-
179. Goya, I., Gutierrez, J., Varona, R., Kremer, L., Zaballos, A., and Marquez, G. (1998) *J Immunol* **160**, 1975-1981
 180. Roos, R. S., Loetscher, M., Legler, D. F., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Moser, B. (1997) *J Biol Chem* **272**, 17251-17254
 181. Tiffany, H. L., Lautens, L. L., Gao, J. L., Pease, J., Locati, M., Combadiere, C., Modi, W., Bonner, T. I., and Murphy, P. M. (1997) *J Exp Med* **186**, 165-170
 182. Sugaya, M., Fang, L., Cardones, A. R., Kakinuma, T., Jaber, S. H., Blauvelt, A., and Hwang, S. T. (2006) *J Immunol* **177**, 7665-7672
 183. Blackshear, P. J. (2002) *Biochem Soc Trans* **30**, 945-952
 184. Sandler, H., and Stoecklin, G. (2008) *Biochem Soc Trans* **36**, 491-496
 185. Kortylewski, M., Kujawski, M., Wang, T., Wei, S., Zhang, S., Pilon-Thomas, S., Niu, G., Kay, H., Mule, J., Kerr, W. G., Jove, R., Pardoll, D., and Yu, H. (2005) *Nat Med* **11**, 1314-1321
 186. Cui, Y., Hosui, A., Sun, R., Shen, K., Chen, M., Cam, C., Gao, G., Robinson, W., and Hennighausen, L. (2007) *Hepatology* **46**, 504-513
 187. Yoshimura, A., Ohkubo, T., Kiguchi, T., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Hara, T., and Miyajima, A. (1995) *Embo J* **14**, 2816-2826
 188. Matsumoto, A., Seki, Y., Kubo, M., Ohtsuka, S., Suzuki, A., Hayashi, I., Tsuji, K., Nakahata, T., Okabe, M., Yamada, S., and Yoshimura, A. (1999) *Mol Cell Biol* **19**, 6396-6407
 189. Zhang, J. G., Farley, A., Nicholson, S. E., Willson, T. A., Zugaro, L. M., Simpson, R. J., Moritz, R. L., Cary, D., Richardson, R., Hausmann, G., Kile, B. J., Kent, S. B., Alexander, W. S., Metcalf, D., Hilton, D. J., Nicola, N. A., and Baca, M. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2071-2076
 190. Bresnihan, B. (1999) *J Rheumatol* **26**, 717-719
 191. Grossman, J. M., and Brahn, E. (1997) *J Womens Health* **6**, 627-638
 192. Ridderstad, A., Abedi-Valugerdi, M., and Moller, E. (1991) *Ann Med* **23**, 219-223
 193. McInnes, I. B., and Schett, G. (2007) *Nat Rev Immunol* **7**, 429-442
 194. Abramson, S. B., and Amin, A. (2002) *Rheumatology (Oxford)* **41**, 972-980
 195. Catrina, A. I., Lampa, J., Ernestam, S., af Klint, E., Bratt, J., Klareskog, L., and Ulfgren, A. K. (2002) *Rheumatology (Oxford)* **41**, 484-489
 196. Feige, U., Hu, Y. L., Gasser, J., Campagnuolo, G., Munyakazi, L., and Bolon, B. (2000) *Cell Mol Life Sci* **57**, 1457-1470
 197. Maini, R. N., and Taylor, P. C. (2000) *Annu Rev Med* **51**, 207-229
 198. Hui, W., Bell, M., and Carroll, G. (1997) *Ann Rheum Dis* **56**, 184-187
 199. Okamoto, H., Yamamura, M., Morita, Y., Harada, S., Makino, H., and Ota, Z. (1997) *Arthritis Rheum* **40**, 1096-1105
 200. Raza, K., Falciani, F., Curnow, S. J., Ross, E. J., Lee, C. Y., Akbar, A. N., Lord, J. M., Gordon, C., Buckley, C. D., and Salmon, M. (2005) *Arthritis Res Ther* **7**, R784-795
 201. Brown, T. J., Lioubin, M. N., and Marquardt, H. (1987) *J Immunol* **139**, 2977-2983
 202. Grenier, A., Dehoux, M., Boutten, A., Arce-Vicioso, M., Durand, G., Gougerot-Pocidallo, M. A., and Chollet-Martin, S. (1999) *Blood* **93**, 1413-1421
 203. Langdon, C., Kerr, C., Hassen, M., Hara, T., Arsenault, A. L., and Richards, C. D. (2000) *Am J Pathol* **157**, 1187-1196
 204. de Hooge, A. S., van de Loo, F. A., Bennink, M. B., de Jong, D. S., Arntz, O. J., Lubberts, E., Richards, C. D., and van den Berg, W. B. (2002) *Am J Pathol* **160**, 1733-1743
 205. Plater-Zyberk, C., Buckton, J., Thompson, S., Spaul, J., Zanders, E., Papworth, J., and Life, P. F. (2001) *Arthritis Rheum* **44**, 2697-2702
 206. Cawston, T. E., Curry, V. A., Summers, C. A., Clark, I. M., Riley, G. P., Life, P. F., Spaul, J. R., Goldring, M. B., Koshy, P. J., Rowan, A. D., and Shingleton, W. D. (1998) *Arthritis Rheum* **41**, 1760-1771
 207. Fearon, U., Mullan, R., Markham, T., Connolly, M., Sullivan, S., Poole, A. R., FitzGerald, O., Bresnihan, B., and Veale, D. J. (2006) *Arthritis Rheum* **54**, 3152-3162
 208. Hui, W., Rowan, A. D., Richards, C. D., and Cawston, T. E. (2003) *Arthritis Rheum* **48**, 3404-3418
 209. Li, W. Q., Dehnade, F., and Zafarullah, M. (2001) *J Immunol* **166**, 3491-3498
 210. Richards, C. D., Shoyab, M., Brown, T. J., and Gauldie, J. (1993) *J Immunol* **150**, 5596-5603

-
211. Koshy, P. J., Henderson, N., Logan, C., Life, P. F., Cawston, T. E., and Rowan, A. D. (2002) *Ann Rheum Dis* **61**, 704-713
 212. Rowan, A. D., Koshy, P. J., Shingleton, W. D., Degnan, B. A., Heath, J. K., Vernallis, A. B., Spaul, J. R., Life, P. F., Hudson, K., and Cawston, T. E. (2001) *Arthritis Rheum* **44**, 1620-1632
 213. Iwamoto, T., Okamoto, H., Kobayashi, S., Ikari, K., Toyama, Y., Tomatsu, T., Kamatani, N., and Momohara, S. (2007) *Febs J* **274**, 4904-4912
 214. Garcia-Zepeda, E. A., Combadiere, C., Rothenberg, M. E., Sarafi, M. N., Lavigne, F., Hamid, Q., Murphy, P. M., and Luster, A. D. (1996) *J Immunol* **157**, 5613-5626
 215. Uguccioni, M., Loetscher, P., Forssmann, U., Dewald, B., Li, H., Lima, S. H., Li, Y., Kreider, B., Garotta, G., Thelen, M., and Baggiolini, M. (1996) *J Exp Med* **183**, 2379-2384
 216. Kalayci, O., Sonna, L. A., Woodruff, P. G., Camargo, C. A., Jr., Luster, A. D., and Lilly, C. M. (2004) *J Asthma* **41**, 27-33
 217. Taha, R. A., Minshall, E. M., Leung, D. Y., Boguniewicz, M., Luster, A., Muro, S., Toda, M., and Hamid, Q. A. (2000) *J Allergy Clin Immunol* **105**, 1002-1007
 218. Hintzen, C., Haan, C., Tuckermann, J. P., Heinrich, P. C., and Hermanns, H. M. (2008) *J Immunol* **181**, 7341-7349
 219. Ikeuchi, H., Kuroiwa, T., Hiramatsu, N., Kaneko, Y., Hiromura, K., Ueki, K., and Nojima, Y. (2005) *Arthritis Rheum* **52**, 1037-1046
 220. Pap, T., Nawrath, M., Heinrich, J., Bosse, M., Baier, A., Hummel, K. M., Petrow, P., Kuchen, S., Michel, B. A., Gay, R. E., Muller-Ladner, U., Moelling, K., and Gay, S. (2004) *Arthritis Rheum* **50**, 2794-2802
 221. Brown, T. J., Liu, J., Brashem-Stein, C., and Shoyab, M. (1993) *Blood* **82**, 33-37
 222. Parsonage, G., Falciani, F., Burman, A., Filer, A., Ross, E., Bofill, M., Martin, S., Salmon, M., and Buckley, C. D. (2003) *Thromb Haemost* **90**, 688-697
 223. Theofilopoulos, A. N., Baccala, R., Beutler, B., and Kono, D. H. (2005) *Annu Rev Immunol* **23**, 307-336
 224. Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001) *Nat Immunol* **2**, 675-680
 225. Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003) *Annu Rev Immunol* **21**, 335-376
 226. Takeda, K., and Akira, S. (2005) *Int Immunol* **17**, 1-14
 227. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001) *Nature* **413**, 732-738
 228. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S. (2003) *Science* **301**, 640-643
 229. Andrejeva, J., Childs, K. S., Young, D. F., Carlos, T. S., Stock, N., Goodbourn, S., and Randall, R. E. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17264-17269
 230. Kovacsics, M., Martinon, F., Micheau, O., Bodmer, J. L., Hofmann, K., and Tschopp, J. (2002) *Curr Biol* **12**, 838-843
 231. Rothenfusser, S., Goutagny, N., DiPerna, G., Gong, M., Monks, B. G., Schoenemeyer, A., Yamamoto, M., Akira, S., and Fitzgerald, K. A. (2005) *J Immunol* **175**, 5260-5268
 232. Akira, S., and Takeda, K. (2004) *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511
 233. Kaisho, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Hoshino, K., and Akira, S. (2001) *J Immunol* **166**, 5688-5694
 234. Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999) *Immunity* **11**, 115-122
 235. Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Muhlrad, P. F., Sato, S., Hoshino, K., and Akira, S. (2001) *J Immunol* **167**, 5887-5894
 236. Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004) *Nat Immunol* **5**, 987-995
 237. Le Bon, A., and Tough, D. F. (2002) *Curr Opin Immunol* **14**, 432-436
 238. Imanishi, J. (2000) *J Biochem* **127**, 525-530
 239. Matsumiya, T., Prescott, S. M., and Stafforini, D. M. (2007) *J Immunol* **179**, 4542-4549
 240. Kovarik, P., Stoiber, D., Novy, M., and Decker, T. (1998) *Embo J* **17**, 3660-3668
 241. Gollob, J. A., Schnipper, C. P., Murphy, E. A., Ritz, J., and Frank, D. A. (1999) *J Immunol* **162**, 4472-4481
 242. Kovarik, P., Stoiber, D., Eysers, P. A., Menghini, R., Neining, A., Gaestel, M., Cohen, P., and Decker, T. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13956-13961
 243. Eilers, A., Georgellis, D., Klose, B., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A. G., Wilks, A. F., and Decker, T. (1995) *Mol Cell Biol* **15**, 3579-3586
 244. Ng, J., and Cantrell, D. (1997) *J Biol Chem* **272**, 24542-24549

-
245. Zhang, X., Blenis, J., Li, H. C., Schindler, C., and Chen-Kiang, S. (1995) *Science* **267**, 1990-1994
 246. Goh, K. C., Haque, S. J., and Williams, B. R. (1999) *Embo J* **18**, 5601-5608
 247. Stoiber, D., Kovarik, P., Cohnhey, S., Johnston, J. A., Steinlein, P., and Decker, T. (1999) *J Immunol* **163**, 2640-2647
 248. Wen, Z., and Darnell, J. E., Jr. (1997) *Nucleic Acids Res* **25**, 2062-2067
 249. Kang, D. C., Gopalkrishnan, R. V., Lin, L., Randolph, A., Valerie, K., Pestka, S., and Fisher, P. B. (2004) *Oncogene* **23**, 1789-1800
 250. Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P. M., and Hiscott, J. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 2986-2996
 251. Weaver, B. K., Kumar, K. P., and Reich, N. C. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 1359-1368
 252. Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, E., and Fujita, T. (1998) *Embo J* **17**, 1087-1095
 253. Costa-Pereira, A. P., Williams, T. M., Strobl, B., Watling, D., Briscoe, J., and Kerr, I. M. (2002) *J Virol* **76**, 9060-9068
 254. Shay, D. K., Holman, R. C., Roosevelt, G. E., Clarke, M. J., and Anderson, L. J. (2001) *J Infect Dis* **183**, 16-22
 255. Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y. M., Gale, M., Jr., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A., and Fujita, T. (2005) *J Immunol* **175**, 2851-2858
 256. Gitlin, L., Barchet, W., Gilfillan, S., Cella, M., Beutler, B., Flavell, R. A., Diamond, M. S., and Colonna, M. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8459-8464
 257. Childs, K., Stock, N., Ross, C., Andrejeva, J., Hilton, L., Skinner, M., Randall, R., and Goodbourn, S. (2007) *Virology* **359**, 190-200
 258. Guo, Z., Chen, L. M., Zeng, H., Gomez, J. A., Plowden, J., Fujita, T., Katz, J. M., Donis, R. O., and Sambhara, S. (2007) *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**, 263-269
 259. Mibayashi, M., Martinez-Sobrido, L., Loo, Y. M., Cardenas, W. B., Gale, M., Jr., and Garcia-Sastre, A. (2007) *J Virol* **81**, 514-524
 260. Opitz, B., Rejaibi, A., Dauber, B., Eckhard, J., Vinzing, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Suttorp, N., and Wolff, T. (2007) *Cell Microbiol* **9**, 930-938
 261. Ahmed, M., and Lyles, D. S. (1998) *J Virol* **72**, 8413-8419
 262. Ferran, M. C., and Lucas-Lenard, J. M. (1997) *J Virol* **71**, 371-377
 263. Ebert, L. M., Meuter, S., and Moser, B. (2006) *J Immunol* **176**, 4331-4336
 264. Pap, T., Nawrath, M., Heinrich, J., Bosse, M., Baier, H., Hummel, K. M., Petrow, P., Kuchen, S., Michael, B. A., Gay, R. E., Müller-Ladner, U., Moelling, K., and Gay, S. (2004) *Arthritis Rheum* **50**, 2794-2802
 265. Nakasa, T., Miyaki, S., Okubo, A., Hashimoto, M., Naka, T., Nishita, K., Ochi, M., and Asahara, H. (2008) *Arthritis Rheum* **58**, 1284-1292
 266. Stanczyk, J., Pedrioli, D. M., Brentano, F., Kolling, C., Gay, R. E., Detmar, M., Gay, S., and Kyburz, D. (2008) *Arthritis Rheum* **58**, 1001-1009
 267. Dean, R. A., Cox, J. H., Bellac, C., Doucet, A., Starr, A. E., and Overall, C. M. (2008) *Blood* **112**, 3455-3464
 268. Ensoli, F., Fiorelli, V., DeCristofaro, M., Santini Muratori, D., Novi, A., Vannelli, B., Thiele, C. J., Luzi, G., and Aiuti, F. (1999) *J Immunol* **162**, 6268-6277
 269. Vecchiet, J., Dalessandro, M., Falasca, K., Di Iorio, A., Travasi, F., Zingariello, P., Schiavone, C., Ensoli, F., Pizzigallo, E., and Paganelli, R. (2003) *J Acquir Immune Defic Syndr* **32**, 464-465
 270. Cai, J., Gill, P. S., Masood, R., Chandrasoma, P., Jung, B., Law, R. E., and Radka, S. F. (1994) *Am J Pathol* **145**, 74-79

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation:

„Molekulare Mechanismen der Oncostatin M-vermittelten Signaltransduktion und deren Bedeutung in der Entzündung sowie der antiviralen Immunabwehr“

selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Dabei wurden nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt.

Würzburg, im Februar 2009

Lebenslauf

Name **Christoph Hintzen**

Geburtsdatum 01.07.1978

Geburtsort Jülich

Nationalität deutsch

Familienstand ledig

Schulbesuch

07/1985 – 07/1989 Katholische Grundschule, Linnich

08/1989 – 06/1998 „Gymnasium Haus Overbach“, Jülich

Schulabschluss

19.06.1998 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

07/1998 – 08/1999 Zivildienstleistender, Deutsches Rotes Kreuz, Linnich

Hochschulstudium

10/1999 – 12/2003 Studium der Biologie, RWTH Aachen

01/2004 – 11/2004 Diplomarbeit am Institut für Biochemie der RWTH Aachen mit dem Thema: „Studien zur Oncostatin M-induzierten Aktivierung von STAT5 und Expression von MCP-2“

Studienabschluss

15.11.2004 Diplom-Biologe

berufliche Tätigkeit

01/2005 – 06/2005 Forschungsaufenthalt an der „University of Witwatersrand“, Johannesburg (RSA)

07/2005 – 09/2007 wissenschaftlicher Angestellter im Institut für Biochemie der RWTH Aachen

seit 10/2007 wissenschaftlicher Angestellter am Rudolf Virchow Zentrum, Würzburg

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Peter C. Heinrich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe in Aachen, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen sowie für sein stetes Interesse am Fortgang der Experimente auch nach seiner Emeritierung danken.

Großen Dank schulde ich vor allem PD Dr. Heike M. Hermanns, die mir als Betreuerin dieser Arbeit stets geduldig und vertrauensvoll zur Seite stand, meine Arbeit mit der Bereitschaft zum inhaltlichen Diskurs sowie zahlreichen Ratschlägen bereicherte, mir ab Oktober 2007 die Möglichkeit bot, in ihrer eigenen Arbeitsgruppe am Rudolf Virchow Zentrum in Würzburg zu arbeiten und letztlich auch als Gutachterin dieser Dissertation zur Verfügung stand.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Thomas D. Müller, der sich ohne Zögern dazu bereit erklärte, ein Gutachten für diese Arbeit zu erstellen.

Vielen lieben Dank an Saskia Quaiser für die durch Höhen und Tiefen hinweg tolle Zusammenarbeit beim CCL13-Projekt.

Ein allgemeines Dankwort an alle meine Mit-Forscher in Aachen (insbesondere Dr. Claudia Stroß, Dr. Ulrike Sommer, Barbara Lippok, Tanja Nöcker, Caroline Jacobi und PD Dr. Serge Haan) sowie in Würzburg (namentlich Julia Erb, Dr. Christine Mais, Daniela Kraemer, Christoph Groß und Johannes Drechsler), die allesamt zur angenehmen Atmosphäre im jeweiligen Institut beitrugen. Die Zusammenarbeit mit ihnen war eine wichtige Voraussetzung für das Entstehen und das Gelingen meiner Arbeit.

Dr. Christine Mais danke ich zudem für ihre große Hilfe beim Korrigieren dieser Arbeit.

Meiner Freundin Christine danke ich herzlichst für ihre liebevolle Unterstützung in allen Höhen und Tiefen und ihren unermüdlichen Einsatz für mein Wohlergehen zu sorgen.

Meinen Eltern und meinen Großeltern danke ich für den steten Rückhalt und alles, was sie mir im Laufe der Jahre mit auf den Weg gegeben haben.